

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11)特許出願公表番号

特表平9-501183

(43)公表日 平成9年(1997)2月4日

(51)Int.Cl. <sup>6</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	
A 6 1 K 45/00	ABG	8415-4C	A 6 1 K 45/00	ABG
31/405	ADU	9454-4C	31/405	ADU
C 0 7 D 209/20		9159-4C	C 0 7 D 209/20	

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全105頁)

(21)出願番号 特願平7-519668  
(86)(22)出願日 平成7年(1995)1月20日  
(85)翻訳文提出日 平成7年(1995)9月21日  
(86)国際出願番号 PCT/US95/00783  
(87)国際公開番号 WO95/19965  
(87)国際公開日 平成7年(1995)7月27日  
(31)優先権主張番号 08/184, 727  
(32)優先日 1994年1月21日  
(33)優先権主張国 米国 (US)  
(81)指定国 EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), AU, CA, JP

(71)出願人 グリコメド・インコーポレイテッド  
アメリカ合衆国94501カリフォルニア、アラメダ、アトランティック・アベニュー860番  
(72)発明者 レビー、ダニエル・イー  
アメリカ合衆国、94501カリフォルニア、オークランド、クレメンズ・ロード1733番  
(72)発明者 グロベルニー、ダミアン  
オーストラリア国3087ビクトリア、ワットソニア・ノース、ロングフィールド・コート11番  
(74)代理人 弁理士 青山 葆 (外1名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 合成間質メタロプロテアーゼ抑制剤およびその用途

(57)【要約】

好ましくない哺乳動物間質メタロプロテアーゼ活性に起因する疾病、たとえば、皮膚疾患、円錐角膜、再狭窄、慢性リウマチ関節炎、創傷、癌、脈管形成、およびショックの予防および治療に有用な合成哺乳動物間質メタロプロテアーゼ抑制剤を開示する。

1. 好ましくない哺乳動物の間質メタロプロテアーゼ活性に起因する疾病にかかった動物に、合成の哺乳動物間質メタロプロテアーゼ抑制剤の有効量を有効期間投与することを特徴とする、動物における該疾病の予防または治療方法。

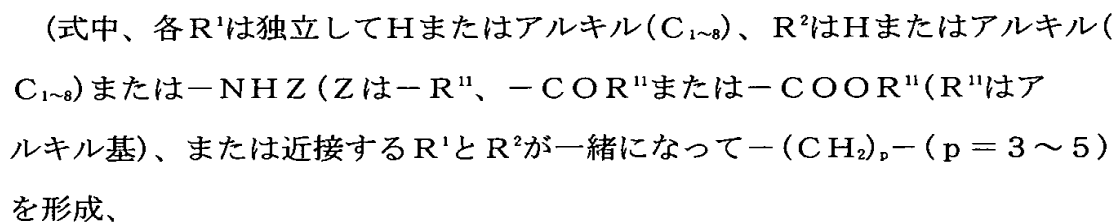
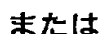
3. 該疾病が慢性リウマチ関節炎である請求項2の方法。

5. 該創傷が慢性皮膚創傷である請求項2の方法。

7. 該疾病が癌である請求項2の方法。

8. 該疾病が脈管形成である請求項2の方法。

9. 該抑制剤が、式



R<sup>3</sup>はHまたはアルキル(C<sub>1</sub>~4)、

R'は融合または複合、非置換または置換のビスクロアリールメチレン、

$n$ は0、1または2、 $m$ は0または1、および

Xは $-\text{OR}^5$ 、 $-\text{NHR}^5$ 、 $-\text{M}$ または $-\text{NH}(\text{CH}_2)_n\text{M}$  ( $\text{R}^5$ はHまたは置換ま

$q$  は  $1 \sim 8$  の整数、および

該 $-\text{CONR}^3$ -アミド結合は、 $-\text{CH}_2\text{NR}^3-$ 、 $-\text{CH}_2\text{CHR}^3-$ 、 $-\text{CH}=\text{CR}^3-$ 、 $-\text{COCHR}^3-$ 、 $-\text{CHOHCHR}^3-$ 、 $-\text{NR}^3\text{CO}-$ 、および $-\text{CF}=\text{CR}^3-$ から選ばれる等量の改変結合で置換していてもよい

で示される物質である請求項1の方法。

$$\text{Y}-\left[ \underset{\text{R}^1}{\text{CH}} \right]_n-\underset{\text{R}^2}{\text{CH}}\text{CON}-\underset{\text{R}^3}{\text{CH}}\underset{\text{R}^4}{\text{COX}} \quad (3)$$
$$\text{Y}-\left[ \begin{array}{c} \text{CH} \\ | \\ \text{R}^1 \end{array} \right]_m - \left[ \begin{array}{c} \text{C}=\text{CH} \\ | \quad | \\ \text{R}^1 \quad \text{R}^2 \end{array} \text{CON}-\text{CHCOX} \right]_n \quad (4)$$

R<sup>3</sup>はHまたはアルキル(C<sub>1</sub>~<sub>4</sub>)、

nは0、1または2、mは0または1、および

Xは $-\text{OR}^5$ 、 $-\text{NHR}^5$ 、 $-\text{M}$ または $-\text{NH}(\text{CH}_2)_q\text{M}$ ( $\text{R}^5$ はHまたは置換または非置換アルキル( $\text{C}_{1\sim 12}$ )、アリール( $\text{C}_{6\sim 12}$ )、アリールアルキル( $\text{C}_{6\sim 16}$ )),  $\text{M}$ はアミノ酸残基またはそのアミド、または環状アミンまたは複素環アミンの残基)、

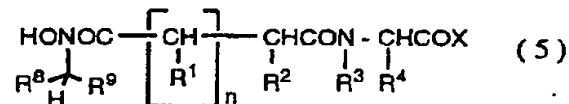
q は 1 ～ 8 の整数、および

Y は  $R^7ONR^6CONR^6-$ 、 $R^6NCONOR^7-$ 、 $R^6CONOR^7-$  および  $-COOR^{12}$  (各  $R^6$  は独立して H または低級アルキル ( $C_{1\sim4}$ )、 $R^7$  は H、低級アルキル ( $C_{1\sim4}$ )、またはアシル基、および  $R^{12}$  は H またはアルキル ( $C_{1\sim6}$ ) または  $-OCH_2O-$  アシル、

該  $-CONR^3-$  アミド結合は、 $-CH_2NR^3-$ 、 $-CH_2CHR^3-$ 、 $-CH=CR^3-$ 、 $-COCHR^3-$ 、 $-CHOHCHR^3-$ 、 $-NR^3CO-$ 、および  $CF=CR^3-$  から選ばれる等量の改変結合で置換していてもよい  
で示される物質である請求項 1 の方法。

1 1. Y が  $-COOR^{12}$  ( $R^{12}$  は H またはアルキル ( $C_{1\sim6}$ ) または  $-OCH_2O-$  アシル) である請求項 10 の方法。

1 2. 該抑制剤が、式



(式中、各  $R^1$  は独立して H またはアルキル ( $C_{1\sim8}$ )、アリールアルキル ( $C_{1\sim4}$ ) またはアリール  $-S-$  アルキル ( $C_{1\sim4}$ )、および  $R^2$  は H またはアルキル ( $C_{1\sim8}$ )、アルケニル ( $C_{2\sim6}$ )、アリールアルキル ( $C_{1\sim6}$ )、または  $-NHZ$  ( $Z$  は  $-R^{11}$ 、 $-COR^{11}$  または  $-COOR^{11}$  ( $R^{11}$  はアルキル基)、または近接する  $R^{11}$  および  $R^2$  が一緒になって  $-(CH_2)_p-$  ( $p = 3 \sim 5$ ) を形成、

n は 0、1 または 2、

$R^3$  は H またはアルキル ( $C_{1\sim4}$ )、

$R^4$  は融合または複合、非置換または置換のビスクロアリールメチレン、非置換または置換アリールメチレン、アルキル ( $C_{1\sim12}$ )、

X は  $-OR^5$ 、 $-NHR^5$ 、 $-M$  または  $-NH(CH_2)_qM$  ( $R^5$  は H または置換または非置換アルキル ( $C_{1\sim12}$ )、アリール ( $C_{6\sim12}$ )、アリールアルキル ( $C_{6\sim16}$ )、M はアミノ酸残基またはそのアミド、または環状アミンまたは複素環アミンの残基)、

q は 1 ～ 8 の整数、および

R<sup>8</sup>はHまたはCH<sub>3</sub>、

R<sup>9</sup>は置換していてもよいアリール、アリールアルキル(C<sub>1~6</sub>)、置換または非置換アルキル(C<sub>1~12</sub>)、-O-アルキル(C<sub>1~6</sub>)、-S-アルキル(C<sub>1~6</sub>)、-OCOR<sup>10</sup>、-OCOOR<sup>10</sup>、5-メチル-2-オキソ-1,3-ジオキソール-4-イル、-COOH、-COOR<sup>10</sup>、-CONH<sub>2</sub>、および

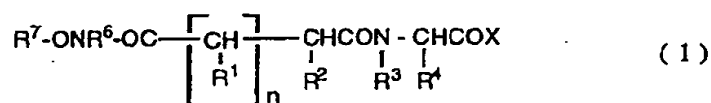
R<sup>10</sup>はアルキル(C<sub>1~12</sub>)、R<sup>3</sup>はHまたはアルキル(C<sub>1~4</sub>)

で示される物質である請求項1の方法。

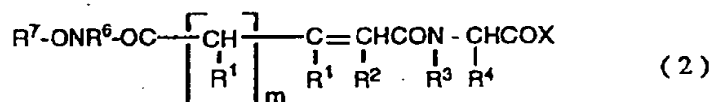
13. 該抑制剤がNH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>(i-ブチル)CO-L-Trp-NHメチルである請求項10の方法。

14. 合成の哺乳動物間質メタロプロテアーゼ抑制剤を含有することを特徴とする、好ましくない哺乳動物間質メタロプロテアーゼ活性に起因する動物における疾病の予防、治療用組成物。

15. 該抑制剤が、式



または



(式中、各R<sup>1</sup>は独立してHまたはアルキル(C<sub>1~8</sub>)、R<sup>2</sup>はHまたはアルキル(C<sub>1~8</sub>)または-NHZ(Zは-R<sup>11</sup>、-COR<sup>11</sup>または-COOR<sup>11</sup>(R<sup>11</sup>はアルキル基)、または近接するR<sup>1</sup>とR<sup>2</sup>が一緒になって-(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>-(p=3~5)を形成、

R<sup>3</sup>はHまたはアルキル(C<sub>1~4</sub>)、

R<sup>4</sup>は融合または複合、非置換または置換のビスクロアリールメチレン、

nは0、1または2、mが0または1、および

Xは-OR<sup>5</sup>、-NHR<sup>5</sup>、-Mまたは-NH(CH<sub>2</sub>)<sub>q</sub>M(R<sup>5</sup>はHまたは置換ま

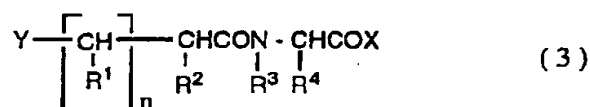
たは非置換アルキル(C<sub>1~12</sub>)、アリール(C<sub>6~12</sub>)、アリールアルキル(C<sub>6~16</sub>)、Mはアミノ酸残基またはそのアミド、または環状アミンまたは複素環アミンの残基)、

q は1~8の整数、および

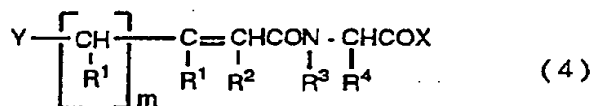
R<sup>6</sup>はHまたは低級アルキル(C<sub>1~4</sub>)およびR<sup>7</sup>はH、低級アルキル(C<sub>1~4</sub>)またはアシル基、

該-CONR<sup>3</sup>-アミド結合は、-CH<sub>2</sub>NR<sup>3</sup>-、-CH<sub>2</sub>CHR<sup>3</sup>-、-CH=CR<sup>3</sup>-、-COCHR<sup>3</sup>-、-CHOHCHR<sup>3</sup>-、-NR<sup>3</sup>CO-、および-CF=CR<sup>3</sup>-から選ばれる等量の改変結合で置換していてもよいで示される物質である請求項14の組成物。

16. 該抑制剤が、式



または



(式中、各R<sup>1</sup>は独立してHまたはアルキル(C<sub>1~8</sub>)、R<sup>2</sup>はHまたはアルキル(C<sub>1~8</sub>)または-NHZ(Zは-R<sup>11</sup>、-COR<sup>11</sup>または-COOR<sup>11</sup>(R<sup>11</sup>はアルキル基)、または近接するR<sup>1</sup>とR<sup>2</sup>が一緒になって-(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>-(p=3~5)を形成、

R<sup>3</sup>はHまたはアルキル(C<sub>1~4</sub>)、

R<sup>4</sup>は融合または複合、非置換または置換のビスクロアリールメチレン、

nは0、1または2、mは0または1、および

Xは-OR<sup>5</sup>、-NHR<sup>5</sup>、-Mまたは-NH(CH<sub>2</sub>)<sub>q</sub>M(R<sup>5</sup>はHまたは置換または非置換アルキル(C<sub>1~12</sub>)、アリール(C<sub>6~12</sub>)、アリールアルキル(C<sub>6~16</sub>))、Mはアミノ酸残基またはそのアミド、または環状アミンまたは複素環アミンの残基)、

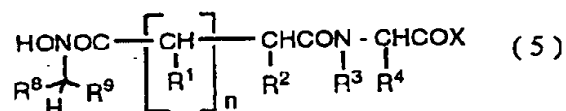
q は1~8の整数、および

Yは $R^7ONR^6CONR^6-$ 、 $R^6NCONOR^7-$ 、 $R^6CONOR^7-$ および  
 $-COOR^{12}$ (各 $R^6$ は独立してHまたは低級アルキル( $C_{1\sim4}$ )、 $R^7$ はH、低級  
 アルキル( $C_{1\sim4}$ )、またはアシル基、および $R^{12}$ はHまたはアルキル( $C_{1\sim6}$ )ま  
 たは $-OCH_2O-$ アシル、

該 $-CONR^3-$ アミド結合は、 $-CH_2NR^3-$ 、 $-CH_2CHR^3-$ 、 $-CH$   
 $=CR^3-$ 、 $-COCHR^3-$ 、 $-CHOHCHR^3-$ 、 $-NR^3CO-$ 、および  
 $CF=CR^3-$ から選ばれる等量の改変結合で置換していてもよい  
 で示される物質である請求項14の組成物。

17. Yが $-COOR^{12}$ ( $R^{12}$ はHまたはアルキル( $C_{1\sim6}$ )または $-OCH_2O-$   
 アシル)である請求項16の組成物。

18. 該抑制剤が、式



(式中、各 $R^1$ は独立してHまたはアルキル( $C_{1\sim8}$ )、アリールアルキル( $C_{1\sim4}$ )  
 またはアリール- $S$ -アルキル( $C_{1\sim8}$ )、および $R^2$ はHまたはアルキル( $C_{1\sim8}$ )、  
 アルケニル( $C_{2\sim6}$ )、アリールアルキル( $C_{1\sim6}$ )、または $-NHZ$ ( $Z$ は  
 $-R^{11}$ 、 $-COR^{11}$ または $-COOR^{11}$ ( $R^{11}$ はアルキル基)、または近接する $R^1$   
 および $R^2$ が一緒になって $-(CH_2)_p-$ ( $p=3\sim5$ )を形成、

$n$ は0、1または2、

$R^4$ は融合または複合、非置換または置換のビスクロアリールメチレン、非置  
 換または置換アリールメチレン、アルキル( $C_{1\sim12}$ )、

$X$ は $-OR^5$ 、 $-NHR^5$ 、 $-M$ または $-NH(CH_2)_qM$ ( $R^5$ はHまたは置換ま  
 たは非置換アルキル( $C_{1\sim12}$ )、アリール( $C_{6\sim12}$ )、アリールアルキル( $C_{6\sim16}$ )、  
 $M$ はアミノ酸残基またはそのアミド、または環状アミンまたは複素環アミン  
 の残基)、

$q$ は1～8の整数、および

$R^8$ はHまたは $CH_3$ 、

R<sup>9</sup>は置換していてもよいアリール、アリールアルキル(C<sub>1~6</sub>)、置換または非置換アルキル(C<sub>1~12</sub>)、-O-アルキル(C<sub>1~6</sub>)、-S-アルキル(C<sub>1~6</sub>)、-OCOR<sup>10</sup>-、-OCOOR<sup>10</sup>、5-メチル-2-オキソ-1,3-ジオキソール-4-イル、-COOH、-COOR<sup>10</sup>、-CONH<sub>2</sub>、および

R<sup>10</sup>はアルキル(C<sub>1~12</sub>)、

で示される物質である請求項14の組成物。

19. 該抑制剤がNH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO-L-Trp-NHメチルである請求項16の組成物。

20. トリプトファンを酸または酸無水物とカップリングさせてL-トリプトファン誘導体を生成させ、該誘導体をアミンとカップリングさせてL-トリプトファンアミド誘導体を生成させ、ついで該トリプトファンアミド誘導体をL-トリプトファンヒドロキサム酸誘導体に変換する工程からなることを特徴とするL-トリプトファンヒドロキサム酸誘導体の合成方法。

21. 該L-トリプトファンヒドロキサム酸誘導体がN-[D, L-2-イソブチル-3-(N'-ヒドロキシアミドカルボニル)プロパノイル]-トリプトファンメチルアミド(5A)であり、L-トリプトファンをD, L-2-イソブチル-3-(メトキシカルボニル)プロピオン酸(3)とカップリングさせてN-(2RS-2-メトキシカルボニル-4-メチルペンタノイル)-L-トリプトファン(42)を生成させ、該L-トリプトファン誘導体(42)をメチルアミンとカップリングさせてN-[D, L-2-イソブチル-3-(メトキシカルボニル)プロパノイル]-L-トリプトファンメチルアミド(4)を生成させ、該メチルアミドをそのヒドロキサム酸誘導体(5)に変換させ、ついでN-[D, L-2-イソブチル-3-(N'-ヒドロキシアミドカルボニルアミド)プロパノイル]-L-トリプトファンメチルアミド(5A)を結晶化および回収する工程からなる請求項20の方法。

22. 該L-トリプトファンヒドロキサム酸誘導体がN-[D, L-2-イソブチル-3-(N'-ヒドロキシアミドカルボニル)プロパノイル]-トリプトファンメチルアミド(5A)であり、L-トリプトファンをホスゲンと反応させてN-カルボキシ無水物誘導体(83)を生成させ、該N-カルボキシ無水物誘導体(83)



をメチルアミンと反応させ、ついで塩酸で処理してその塩(84)を生成させ、該塩(84)を塩基の存在下にテトラヒドロフラン中イソブチルこはく酸無水物で処理して、カルボン酸(85)および(86)の混合物を生成させ、該カルボン酸(85)および(86)を緩和な条件下にメタノールでエステル化して対応するエステル(4)および(87)を生成させ、該(4)および(87)の混合物を対応するヒドロキサム酸(5A)および(5B)に変換させ、該(5A)および(5B)の混合物から(5A)を結晶化および回収する工程からなる請求項20の方法。

23. 該L-トリプトファンヒドロキサム酸誘導体がN-[D, L-2-イソブチルー3-(N'-ヒドロキシアミドカルボニル)プロパノイル]-トリプトファンメチルアミド(5A)であり、L-トリプトファンをホスゲンと反応させてN-カルボキシ無水物誘導体(83)を生成させ、該N-カルボキシ無水物誘導体(83)をメチルアミンと反応させ、ついで塩酸で処理してその塩(84)を生成させ、該塩(84)を塩基の存在下にテトラヒドロフラン中イソブチルこはく酸無水物で処理して、カルボン酸(85)および(86)の混合物を生成させ、該酸(85)および該酸(86)を酢酸無水物または他のカップリング剤と反応させてこはく酸イミド化合物を生成させ、該こはく酸イミド誘導体をヒドロキシアミノ分解に付してヒドロキサム酸(5A)に変換させ、ついで該ヒドロキサム酸(5A)を回収する工程からなる請求項20の方法。

24. トリプトファンを酸とカップリングさせてL-トリプトファン誘導体を生成させ、該トリプトファン誘導体をアミンとカップリングさせてL-トリプトファンアミド誘導体を生成させ、ついで該L-トリプトファンアミド誘導体を加水分解してN-(2-メトキシカルボニルー4-メチルペンタノイル)-L-トリプトファン(S)-メチルベンジルアミド(39A)を生成させる工程からなることを特徴とするN-(2-メトキシカルボニルー4-メチルペンタノイル)-L-トリプトファン(S)-メチルベンジルアミド(39A)の合成方法。

25. 該L-トリプトファンヒドロキサム酸誘導体がN-[D, L-2-イソブチルー3-(N'-ヒドロキシアミドカルボニル)プロパノイル]-トリプトファンメチルアミド(5A)であり、L-トリプトファンをD, L-2-イソブチルー3-(メトキ

シカルボニル)プロピオン酸(3)とカップリングさせてN-(2RS-2-メトキシカルボニル-4-メチルペンタノイル)-L-トリプトファン(43)を生成させ、該L-トリプトファン誘導体(43)を(S)-メチルベンジルアミンとカップリングさせてN-(2-メトキシカルボニル-4-メチルペンタノイル)-L-トリプトファン(S)-メチルベンジルアミド(39A)を生成させる工程からなる請求項24の方法。

26. マレイン酸無水物を2-メチルプロペンとカップリングさせてβ-メタリルこはく酸無水物を生成させ、該β-メタリルこはく酸無水物をイソブチルコハク酸無水物に還元し、該イソブチルこはく酸を無水メタノールで処理して、D, L-2-イソブチル-3-(メトキシカルボニル)プロピオン酸(3)を生成させ、ついで該D, L-2-イソブチル-3-(メトキシカルボニル)プロピオン酸(3)を回収する工程からなることを特徴とするD, L-2-イソブチル-3-(メトキシカルボニル)プロピオン酸(3)の合成方法。

27. D, L-2-イソブチル-3-(メトキシカルボニル)プロピオン酸(3)のジアステレオマー混合物を分割して単一のジアステレオマー(3A)を得る請求項26の方法。

28. 該D, L-2-イソブチル-3-(メトキシカルボニル)プロピオン酸(3)のジアステレオマー混合物をS-メチルベンジルアミンとカップリングさせてジアステレオマー塩混合物を生成させ、該ジアステレオマー塩混合物をエタノール/ジエチルエーテルから再結晶させて単一のジアステレオマー塩(44)を生成させ、該塩(44)を重炭酸ナトリウム飽和水溶液ついで6N塩酸で処理して(R)-2-イソブチル-3-(メトキシカルボニル)プロピオン酸(3A)を生成させる工程からなることを特徴とする請求項27の方法。

## 【発明の詳細な説明】

### 合成間質メタロプロテアーゼ抑制剤およびその用途

#### 技術分野

本発明は、間質メタロプロテアーゼの抑制剤である合成化合物、およびその医学的応用に関する。

#### 関連技術

構造タンパク質の分解を行い、メタロプロテアーゼに構造的に関連した多数の酵素が存在する。これらには、ヒト皮膚線維芽細胞コラゲナーゼ、ヒト皮膚線維芽細胞ゼラチナーゼ、ヒト好中球コラゲナーゼおよびゼラチナーゼ、およびヒトストロメリシン (stromelysin) が含まれる。これらは、アンジオテンシン変換酵素やエンケファリナーゼと同様、亜鉛含有メタロプロテアーゼである。

コラゲナーゼおよびその関連酵素は、慢性関節リウマチ (ムリンズ (Mullins, D. E.) ら、Biochim Biophys Acta (1985) 695: 117~214) ; 腫瘍細胞の転移 (同書、ブロードハースト (Broadhurst, M. J.) ら、E P 出願 276436 (1987)、ライヒ (Reich, R.) ら、Cancer Res (1988) 48: 3307~3312) ; および種々の潰瘍状態を含む幾つかの疾患の総合的症状を媒体するうえで重要である。潰瘍形成性状態は、アルカリ火傷の結果、またはシュードモナス・エルジノーサ (*Pseudomonas aeruginosa*)、アカンタアメーバ (*Acanthamoeba*)、単純ヘルペスおよびワクシニアウイルスによる感染の結果、角膜となる。望ましくない間質メタロプロテアーゼ活性を特徴とする他の状態としては、歯周病、表皮水泡症および強膜炎が挙げられる。

コラゲナーゼが多数の疾患状態に関与していることから、この酵素の抑制剤を調製しようとする試みがなされている。幾つかのかかる抑制剤が、サール (G. D. Searle) の E P 出願第 126,974 号 (1984 年公開) および同第 159,396 号に開示されている。これら抑制剤は、アミノ窒素に結合した両置換基中の 2-位にオキシ置換基を有する第二級アミンである。

本発明の化合物に一層関連したものとしては、サールの米国特許第 4,599,361 号および同第 4,743,587 号に開示された化合物が挙げられる。これ

ら化合物は、その一部にチロシンまたは誘導体化チロシンまたはそれらのある種の類似体を有するヒドロキシルアミンジペプチド誘導体である。

スルフヒドリル残基並びにフェニルアラニンやトリプトファンなどの芳香族アミノ酸残基を含有する他の化合物がPCT出願WO 88/06890号に開示されている。これら化合物の幾つかはまたi-ブチル側鎖を有する。

EP出願第498,665号（発明者はベケット（Beckett, R. P.）ら）には、ヒドロキサム酸誘導体の製造法およびその用途が記載されている。

PCT出願WO 92/21360号（発明者はサフー（Sahoo, S.）ら）には、置換N-カルボキシアルキルペプチジル誘導体、および変形性関節炎、慢性関節リウマチ、ある種の癌および角膜潰瘍形成を含むある種の疾患の治療にこれら化合物を応用することが記載されている。

EP出願第497,192号（発明者はロップ（Lobb, R.）ら、）には、薬理学的特性を有するペプチドコラゲナーゼ抑制剤が呈示されている。

米国特許第4,681,894号（発明者はマレイ（Murray, W.）ら）には、抗炎症剤として有用なヒドロキサム酸およびエステルが呈示されている。

米国特許第4,943,587号（発明者はチェテンコ（Cetenko）ら）には、選択された非ステロイド性抗炎症剤のアシル残基のヒドロキサム酸誘導体が記載されている。これら化合物の医学用途もまた示されている。

米国特許第4,918,105号（発明者はカートライト（Cartwright, T.）ら）には、コラゲナーゼ抑制作用を有する化合物が呈示されている。関節炎、潰瘍形成および腫瘍浸潤を含むある種の医学的応用が記載されている。

EP出願第574,758号（発明者はブロードハーツら）には、変性関節疾患、浸潤性腫瘍、アテローム性動脈硬化症および多発性硬化症の治療および予防のためのコラゲナーゼ抑制剤としてのヒドロキサム酸誘導体が呈示されている。

PCT出願WO 93/23075号（発明者はリアング（Liang, C.）ら）には、血管漏出症候群およびコラゲナーゼにより誘発された疾患の治療のための間質メタロプロテアーゼ抑制剤の使用が記載されている。

抑制剤はまた、関連プロテアーゼであるサーモリシンに関しても開示されている。これらには、ニシノ (Nishino, N.) ら、Biochemistry (1979) 18 : 4340~4347 ; ニシノら、Biochemistry (1978) 17 : 2846~2850によって記載されているヒドロキサム酸ペプチド誘導体が含まれる。トリプトファンもまた種々の状態を治療しうることが知られており、これら疾患の幾つかにはコラゲナーゼが関与している (たとえば、JP 57/058626 ; 米国特許第4,698,342号 ; 同第4,291,048号参照)。また、細菌コラゲナーゼの抑制剤もまた米国特許第4,558,034号に開示されている。

以下に記載する化合物は、間質メタロプロテアーゼに関して優れた抑制活性を有することがわかった。本発明の化合物は、構造タンパク質および本明細書で「間質メタロプロテアーゼ」と称するクラスのタンパク質による望ましくない作用を特徴とする状態および疾患の治療に利用できる薬剤のレパートリーを広げるものである。

本発明の化合物はまた、一つの成員として血管形成を有する疾患を治療するうえでも有用である。血管形成とは、新たな血管、とりわけ毛細管の増殖として定義される。そのような毛細管および補助血管の内方成長は腫瘍の増殖に必須であり、それゆえ、悪性組織の広がりおよび転移を促進する望ましくない生理応答である。それゆえ、血管形成の抑制は悪性腫瘍の有効な治療の一つの成員と考えられる。目の血管新生 (neovascularization) は盲目の主要な原因である。この状態の一つの形態である増殖性糖尿病性網膜症は糖尿病の結果生じる。盲目はまた、血管新生性緑内障によっても生じる。血管形成の抑制は、これら状態を治療するうえでも有用である。

PCT出願WO 91/11193号 (1991年1月25日発行) には、血管形成を抑制するコラゲナーゼ抑制剤の軟骨からの単離が記載されている。この組成物 (軟骨由来抑制剤 (CDI) と称する) は、ウサギ角膜ポケットアッセイにおいて腫瘍により誘発される血管形成を抑制すること、および毛細管の生成を抑制することが報告されている。ペプチドやコラゲナーゼと免疫反応する抗体などの他のコラゲナーゼ抑制剤もまた血管形成を抑制する能力を有することがさら

に推測される。

加えて、E P出願第424,193号(1991年4月24日公開)には、血管形成抑制剤としてのアクチノニン(actinonin)の作用が記載されている。アクチノニンはストレプトマイセス(*Streptomyces*)の特定の株によって産生される抗生物質であり、修飾されたペプチド構造である。

上記2つの出願に開示されているように、望ましくないレベルの血管形成は、腫瘍増殖に関連して存在するばかりでなく、糖尿病性網膜症の結果としての盲目その他の眼科病理の原因でもある。

本発明の化合物はまた、ある種の形態のショック、循環血液量減少性ショックおよび関連症候群の治療にも有用である。一般に、循環血液量減少性ショックは、血液容量または心拍出量または血液の再分布の減少の結果、有効循環容量が不適切となることによる細胞および組織に広がった低灌流として記載されうる。

循環血液量減少性ショック、およびこの状態を研究するモデルは、ショードリー(Chaudry)およびアヤラ(Ayala)の「出血の免疫学的側面(Immunological Aspects of Hemorrhage)」(ランデス(R. G. Landes Co.)、オースチン、テキサス、1992)に記載されている。一般に、血液の喪失に伴う血流の減少による循環血流量減少性ショックの場合、血流の「軟泥化(sludging)」および赤血球による毛細管の「詰まり(plugging)」を生じる。このことが今度は細胞および組織への酸素および栄養物の不十分な提供、他の代謝物の不十分なクリアランス、および好中球および血小板の活性化に導く。この酸化体ストレス(低酸素症)および内皮およびマクロファージからの他の因子の放出がアラキドン酸カスケードおよび化学誘引物質および炎症メディエーターの産生を刺激し、さらに好中球の浸潤をもたらす。好中球、血小板、マクロファージおよび補体カスケードの活性化は、サイトカインを含む数多くの生物学的に活性な因子の放出へと導く。これら因子は内皮、好中球および白血球の表面上の接着分子の発現を刺激し、これによって好中球および白血球を結合させ、最終的に細胞外間質(ECM)および血管および毛細管の基底膜を通して移行させる。この移行または管外遊出は、活性化好中球、白血球および／または血小板によって放出される間質メタロプロ

テイナーゼ、セリンプロテアーゼおよびエンドグリコシダーゼ（すなわち、ヘパリーナーゼ）を含む数多くの細胞外間質分解酵素の作用によるものである。ECMおよび基底膜の損傷の結果、血管透過性の増大、および好中球および白血球による器官への浸潤を生じる。

類似の一連の事象が敗血症性ショックの場合に起こるが、最も重要なことに、炎症応答の基本メディエーターは循環血液量減少性ショックを引き起こすものとは同じではない点異なる。敗血症性ショックにおける初期血液容量の減少は、内毒素が好中球活性化および炎症を媒体するサイトカイン（TNF、IL-1およびIL-6、IL-10、TGF- $\beta$ 等）の放出を刺激した後に血液貯留の結果として起こる。

循環血液量減少性ショックと敗血症性ショックとは異なる疾患であることを心に留めておくことは重要である。循環血液量減少性ショックは、循環系に対する外傷（たとえば、銃の狙撃による傷、自動車での怪我、火傷、刺し傷等）を含む多くの事象によって引き起こされうる循環系の全身虚脱である。これに対し、敗血症性ショックは細菌感染によって引き起こされる。それゆえ、上記のように、これら疾患の原因は区別すべきものである。

虚血／再灌流障害（I/R I）は、減少した血流状態（虚血）の後に炎症に媒体された細胞および器官の損傷を生じる他の例である。

循環血液量減少性ショックに伴う血管障害およびその結果としての種々の器官への好中球および白血球の浸潤は、組織損傷、そして最終的には多臓器不全（MOF）および急性呼吸障害症候群（ARDS）へと導く。破壊性の因子およびメディエーターは数多く、サイトカイン、酵素および種々の他の炎症性因子が含まれる。MOFおよびARDSは重篤なショックで起こり、しばしば死に至る。ショックに有効な治療剤であるためには、微小血管系および種々の器官（肝臓、腎臓、心臓、脾臓および腸）を不全から保護することができなくてはならない。出血性ショックおよびI/R I損傷における胃腸機能の保護および回復の重要性が報告されており、敗血症性合併症の減少、および長期の生存と関係付けられている。発明の開示

本発明の方法および組成物は、根源的な原因として望ましくない間質メタロプロテアーゼ活性の活性化および／または発現を有するある種の疾患を予防または治療するために用いるのが好ましい。そのような疾患としては、皮膚疾患、円錐角膜、再発狭窄症、循環血液量減少性ショック、創傷、潰瘍（とりわけ、角膜または口または皮膚の）、または制御されない血管形成によって好影響を受ける疾患状態、未熟な頸部拡張（premature cervical dilation）、避妊、良性前立腺肥大および子宮内膜症などの生殖器疾患が挙げられる。後者に関しては、本発明は、好ましくは患者の体内の癌の増殖および拡散を容易にしたり必要な血管形成を抑制することによる、癌の治療方法に関する。本発明の化合物によって予防または治療しうる他の疾患としては、臓器拒絶の間に起こったり臓器拒絶の原因となるような、組織または臓器中へのリンパ球の望ましくない浸潤によって媒体される疾患が挙げられる。

間質メタロプロテアーゼ抑制剤のクラスの幾つかの成員は当該技術分野で知られている。他のものは、米国特許出願第07/747,751号（1991年8月20日出願）；同第07/747,752号（1991年8月20日出願）；同第07/615,798号（1990年11月21日出願）；米国特許第4,996,358号；EP 0497192号；WO 92/09565号；およびEP 0498665号（参照のため本明細書中に引用する）に記載および特許請求されている。

この出願は、1993年4月7日に提出された米国特許出願第08/044,324号の一部継続出願である。米国特許出願第08/044,324号は、1993年12月7日に発行された米国特許第5,268,384号の一部継続出願である。米国特許第5,268,384号は、1993年8月24日に発行された米国特許第5,239,078号および1993年2月23日に発行された米国特許第5,189,178号の一部継続出願であり、これら両出願はまた、1993年2月2日に発行された米国特許第5,183,900号の一部継続出願である。米国特許出願第08/044,324号はまた、1993年12月14日に発行された米国特許第5,270,326号の継続出願であり、後者の出願はまた19



92年5月19日に出願された米国特許第5,114,953号の継続出願である。本明細書中に記載または引用する特許、特許出願および公報はすべて、各個々の公報または特許出願がその全体として明確かつ個々に呈示されるのと同程度に参照のために引用されることが理解されるべきである。

当該技術分野で知られている合成間質メタロプロテアーゼ抑制剤の要約が、E P出願第423,943号(1991年4月24日公開)に記載されている。この出願では、当該技術分野で知られた合成間質メタロプロテアーゼの構造を組み立て、神経系の髄鞘破壊性疾患の治療へのその使用を特許請求している。本発明は、これら化合物、並びに上記米国特許出願に開示された化合物の上記用途および以下に記載する他の用途への使用に関する。

本発明の他の目的は、間質メタロプロテアーゼ抑制剤、該抑制剤のプロドラッグ、その誘導体および類似体の合成のための改良された、効率的な低価格の方法を記載することである。

#### 図面

図1は、P d i B u (パネルA) またはP d i B u および化合物5 A (パネルB) に暴露し、ヘマトキシリンおよびエオシンで染色3日後のマウス皮膚の光学顕微鏡写真を示す。

図2は、術後1～7日に回収した乳房切除流体試料中に存在するプロテアーゼレベルが、創傷流体のコラゲナーゼ/m l の平均 $0.75 \pm 0.06 \mu\text{g}$  当量であったことを示している。

図4は、慢性創傷流体のプロテアーゼ活性に対する3つのプロテアーゼ抑制剤の効果を示す。化合物5 Aは、最終濃度 $40 \mu\text{g}/\text{ml}$  ( $100 \mu\text{M}$ ) または $4 \mu\text{g}/\text{ml}$  ( $10 \mu\text{M}$ ) にてアゾコル (Azocoll) のタンパク質分解を非常に有効に抑制した (最初のタンパク質加水分解活性の約96%)。メタロプロテイナーゼの非特異的抑制剤であるEDTAもまたプロテアーゼ活性を有効に減少させた (約96%)。セリンプロテアーゼの非特異的抑制剤であるPMSFは、 $500 \mu\text{M}$ の濃度にてタンパク質加水分解活性を約65%減少させた。

図5は、解放性および慢性創傷中に存在するプロテアーゼ活性に対する抑制剤

化合物5 A、PMSFおよびEDTAの効果を示す。化合物5 AおよびEDTAは非常に効果的な抑制剤であったが、PMSFは創傷流体のプロテアーゼ活性を有意に減少させなかった。

図6は、創傷流体によるアゾコルのタンパク質加水分解に対する化合物5 A、S1209、UL001、MP506およびEDTAの効果を示す。

図7は、慢性創傷流体中に存在するプロテアーゼに対する化合物5 A、21A、39AおよびS1209の効果を示す。

図8は、チオグリコレート (thioglycollate) により誘発された腹膜炎に対する抑制剤化合物5 Aの効果を示す。

図9は、マウス黒色腫 (B16-F10) モデルにおける化合物5 Aの抗転移効果を示す。

図10Aは、出血後に晶質 (crystalloid) 蘇生の開始後2時間および4時間に疑似手術した (sham-operated) (シャム)、通常食塩水処理した (食塩水)、および化合物5 A処理したラットにおけるインドシアニンググリーン (ICG) のクリアランス (能動輸送プロセス) の最大速度 ( $V_{max}$ ) の変化を示す棒グラフである。各群には6匹の動物を用いた。外傷-出血および蘇生プロトコールおよび化合物5 A注入法は実施例51に記載してある。データは平均 $\pm$ SEとして示しており、一方向 (one-way) ANOVAおよびチューキー試験 (Tukey's test) により比較してある。偽操作群と比べて\* $P < 0.05$ ; 食塩水処理群と比べて# $P < 0.05$ 。

図10Bは、晶質蘇生の開始後2時間および4時間に疑似手術した (シャム)、通常食塩水処理した (食塩水)、および化合物5 A処理したラットにおけるインドシアニンググリーン (ICG) 移行の効率 ( $K_d$ ) の変化を示す棒グラフである。詳細については図10Aの説明を参照。

図11Aは、晶質蘇生の開始後2時間および4時間に疑似手術した (シャム)、通常食塩水処理した (食塩水)、および化合物5 A処理したラットにおける平均動脈圧 (MAP) の変化を示すグラフである。詳細については図10Aの説明を参照。

図11Bは、晶質蘇生の開始後2時間および4時間に疑似手術した（シャム）、通常食塩水処理した（食塩水）、および化合物5A処理したラットにおける心拍数（HR）の変化を示すグラフである。詳細については図10Aの説明を参照。

図12には、グラフA、BおよびCが含まれ、晶質蘇生の開始後2時間および4時間に疑似手術した（シャム）、通常食塩水処理した（食塩水）、および化合物5A処理したラットにおける心拍出量（CO、A）、1回拍出量（SV、B）、および全末梢抵抗（TPR、C）の変化を示す。詳細については図10Aの説明を参照。

図13にはグラフA、B、CおよびDが含まれ、晶質蘇生の開始後2時間および4時間に疑似手術した（シャム）、通常食塩水処理した（食塩水）、および化合物5A処理したラットにおける肝臓（A）、腎臓（B）、脾臓（C）、および小腸（D）での器官表面の微小血管血流量（MBF）の変化を示す。詳細については図10Aの説明を参照。

図14は、抗再発狭窄症アッセイ（4日）における抑制剤5Aの効果を示す。抑制剤5Aの投与は、CMC処理したコントロールと比べて単位面積当たりの細胞数の有意の減少を引き起こした。

図15は、抗再発狭窄症アッセイ（10日）における抑制剤5Aの効果を示す。抑制剤5Aの投与は、CMC処理したコントロールと比べて脈管内膜の横断面積の有意の減少を引き起こした。

#### 発明の実施の態様

本発明の抑制化合物は、哺乳動物間質メタロプロテアーゼの合成抑制剤である。間質メタロプロテアーゼとしては、ヒト皮膚線維芽細胞コラゲナーゼ、ヒト皮膚線維芽細胞ゼラチナーゼ、ヒト好中球コラゲナーゼおよびゼラチナーゼ、およびヒトストロメリシンが挙げられるが、これらに限られるものではない。これらは、アンジオテンシン変換酵素やエンケファリナーゼと同様、亜鉛含有メタロプロテアーゼ酵素である。本明細書において「哺乳動物間質メタロプロテアーゼ」とは、適当なアッセイ条件下でコラーゲン、ゼラチンまたはプロテオグリカンの分解を触媒しうる哺乳動物起原の亜鉛含有酵素を意味する。

適当なアッセイ条件は、たとえば、米国特許第4,743,587号（コーストン（Cawston）らの手順（Anal Biochem（1979）99：340～345）を参照している）に記載されており、合成基質の使用はウエインガーテン（Weingarten, H.）らのBiochem Biophys Res Comm（1984）139：1184～1187に記載されている。もちろん、これら構造タンパク質の分解を分析するためのいかなる標準法も用いることができる。本明細書中に言及する間質メタロプロテアーゼ酵素は、すべて、たとえばヒストロメリシンや皮膚線維芽細胞コラゲナーゼに構造上類似した亜鉛含有プロテアーゼである。

間質メタロプロテアーゼ活性を抑制する候補化合物の能力は、もちろん、上記アッセイで試験することができる。単離した間質メタロプロテアーゼ酵素は、本発明の化合物の抑制活性を確認するのに用いることができるし、または組織を分析しうる所定範囲の酵素を含む粗製の抽出物を用いることができる。

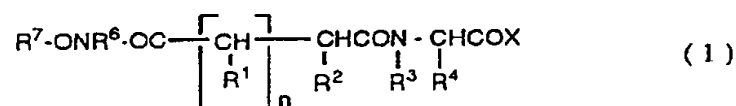
詳しくは、抑制活性のアッセイは以下のようにして行うことができる。抑制剤のアッセイは、コーチルビッツ（Kortylewicz）およびガラーディ（Galardy）のJ Med Chem（1990）33：263～273に正確に記載されているように、pH6.5にて合成チオールエステル基質を用い、粗製のまたは精製したヒト皮膚線維芽細胞コラゲナーゼ、または精製したヒト歯肉線維芽細胞コラゲナーゼ（コラゲナーゼの濃度は1～2 nM）に対して行うことができる。候補抑制剤の試験は、このアッセイにおいて、ヒト皮膚線維芽細胞からの粗製のコラゲナーゼおよびゼラチナーゼ、化膿したヒト好中球からの粗製のコラゲナーゼおよびゼラチナーゼを抑制する能力について行う。その結果は、 $K_i$ 、すなわち、酵素との抑制剤複合体の計算した解離定数として示すことができる。有効な抑制剤の $K_i$ 値は、このアッセイにおいて精製酵素に対して $\leq 500$  nMである。ヒストロメリシンの抑制アッセイは、ティーハン（Teahan, J.）らのBiochemistry（1989）20：8497～8501の記載に従って行う。

抑制活性のアッセイは、ナイト（Knight）ら（FEBS Letters（1992）296：263）によって開発された蛍光発生基質を用いて行うことができる。この方法は、96ウェルプレート形態において基質の加水分解速度を決定するの

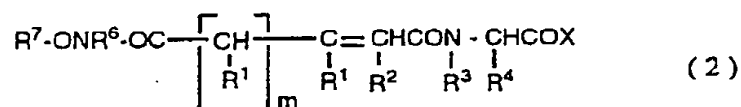
に蛍光計を用いる。反応速度を幾つかの基質濃度および複数の抑制剤レベルで測定する。これらデータを、ラインウイバー-バーク (Lineweaver-Burk)、ディクソン (Dixon) およびヘンダーソン (Henderson) プロット分析 (Enzyme Kinetics (1975) アーウィン・シーガル (Irwin Segal) (ジョン・ウイリー&サンズ・インコーポレーテッド・パブリッシャーズ)) により、およびヘンダーソンの記載 (Biochem J. (1972) 127:321) に従って分析する。基質レベルは10~30  $\mu$ Mの範囲である。抑制剤レベルは、0~90%抑制を与えるべく選択する (0~500 nM)。抑制剤のアッセイは、必要に応じて、精製した72 kDゼラチナーゼ、92 kDゼラチナーゼ、好中球コラゲナーゼ、ストロメリシンその他のプロテアーゼに対して行うことができる。これら酵素を37℃でAPMA (4-アミノフェニルメルクリ酢酸) で活性化し、アッセイは室温で行う。

これら哺乳動物間質メタロプロテアーゼ抑制アッセイにおいて良好な結果の得られた合成化合物は、一般に、少なくとも一つのアミド結合を有し、種々の側鎖置換基を有する小さな分子である。当該技術分野で知られたかかる化合物の例は、上記のように、EP出願第423,943号 (参照のため本明細書に引用する) に記載されている。

他の適当な抑制剤は、式：



または



(式中、各  $R^1$  は独立にHまたはアルキル (1~8 C)、 $R^2$  はHまたはアルキル (1~8 C) または-NHZ (式中、Zは $-R''$ 、 $-COR''$ または $-COOR''$  (式中、 $R''$ はアルキル (1~6) 基)) ; または近位の  $R^1$  と  $R^2$  とが一緒になって $-(CH_2)_p-$  (式中、pは3~5) ;

$R^3$ はHまたはアルキル（1～4 C）；

$R^4$ は融合したまたは共役した非置換または置換の2環アリールメチレン；

$n$ は0、1または2； $m$ は0または1；

$X$ は $-OR^5$ 、 $-NHR^5$ 、 $-M$ または $-NH(CH_2)_qM$ （式中、 $R^5$ はHまたは置換または非置換のアルキル（1～12 C）、アリール（6～12 C）、アリールアルキル（6～16 C）；

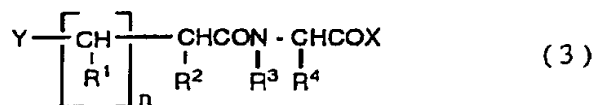
$M$ はアミノ酸残基またはそのアミドまたは環状アミンまたはヘテロ環状アミンの残基；

$q$ は1～8の整数）；

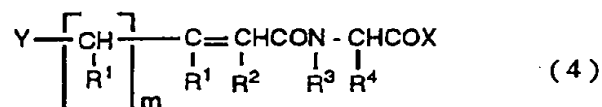
$R^6$ はHまたは低級アルキル（1～4 C）、 $R^7$ はH、低級アルキル（1～4 C）またはアシル基；

図示した $-CONR^3$ -アミド結合は、任意に $-CH_2NR^3-$ 、 $-CH_2CHR^3-$ 、 $-CH=CR^3-$ 、 $-COCHR^3-$ 、 $-CHOHCHR^3-$ 、 $-NR^3CO-$ 、 $-CF=CR^3-$ などの修飾等配電子結合で置換されていてよい）で示されるものである。

本発明の他の化合物としては、式：



または



（式中、各 $R^1$ は独立にHまたはアルキル（1～8 C）、 $R^2$ はHまたはアルキル（1～8 C）または $-NHZ$ （式中、 $Z$ は $-R^{11}$ 、 $-COR^{11}$ または $-COOR^{11}$ （式中、 $R^{11}$ はアルキル（1～6）基））；または近位の $R^1$ と $R^2$ とが一緒になって $-(CH_2)_p-$ （式中、 $p$ は3～5）；

$R^3$ はHまたはアルキル（1～4 C）；

$R^4$ は融合したまたは共役した非置換または置換の2環アリールメチレン；

nは0、1または2；mは0または1；

Xは $-OR^5$ 、 $-NHR^5$ 、 $-M$ または $-NH(CH_2)_qM$ （式中、 $R^5$ はHまたは置換または非置換のアルキル（1～12C）、アリール（6～12C）、アリーラルキル（6～16C）；

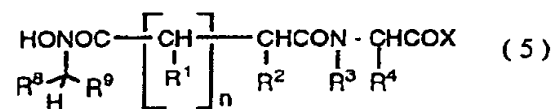
Mはアミノ酸残基またはそのアミドまたは環状アミンまたはヘテロ環状アミンの残基；

qは1～8の整数）；

Yは $R^7ONR^6CONR^6-$ 、 $R^6NCONOR^7$ 、および $R^6CONOR^7-$ または $-COOR^{12}$ （式中、 $R^6$ は独立にHまたは低級アルキル（1～4C）； $R^7$ はH、低級アルキル（1～4C）またはアシル基、 $R^{12}$ はH、アルキル（1～6C）または $-CH_2-O-$ アシル基；）よりなる群から選ばれた基；

図示した $-CONR^3-$ アミド結合は、任意に $-CH_2NR^3-$ 、 $-CH_2CHR^3-$ 、 $-CH=CR^3-$ 、 $-COCHR^3-$ 、 $-CHOHCHR^3-$ 、 $-NR^3CO-$ 、 $-CF=CR^3-$ などの修飾等配電子結合で置換されていてよい）で示される化合物が含まれる。

本発明の他の化合物としては、式：



（式中、各 $R^1$ は独立にHまたはアルキル（1～8C）、アリーラルキル（1～4C）またはアリール-S-アルキル（1～4C）、 $R^2$ はHまたはアルキル（1～8C）、アルケニル（2～6C）、アリーラルキル（1～6C）または $-NHZ$ （式中、Zは $-R^{11}$ 、 $-COR^{11}$ または $-COOR^{11}$ （式中、 $R^{11}$ はアルキル基））；

または近位の $R^1$ と $R^2$ とが一緒になって $-(CH_2)_p-$ （式中、pは3～5）；

nは0、1または2；

$R^3$ はHまたはアルキル（1～4C）；

$R^4$ は融合したまたは共役した非置換または置換の2環アリールメチレン、非置

換または置換のアリールメチレン、アルキル（1～12C）；

Xは $-OR^5$ 、 $-NHR^5$ 、 $-M$ または $-NH(CH_2)_qM$ （式中、 $R^5$ はHまたは置換または非置換のアルキル（1～12C）、アリール（6～12C）、アリールアルキル（6～16C）；

Mはアミノ酸残基またはそのアミドまたは環状アミンまたはヘテロ環状アミンの残基；

qは1～8の整数）；

$R^8$ はHまたは $CH_3$ ；

$R^9$ は任意に置換されたアリール、アリールアルキル（1～6C）、置換または非置換のアルキル（1～12C）、 $-O-$ アルキル（1～6C）、 $-S-$ アルキル（1～6C）、 $-OCOR^{10}$ 、 $-OCOOR^{10}$ 、5-メチル-2-オキソ-1,3-ジオキソル-4-イル、 $-COOH$ 、 $-COOR^{10}$ 、 $-CONH_2$ ；

$R^{10}$ はアルキル（1～12C））で示される化合物が含まれる。

プロドラッグとは、実質的に生物学的に不活性な化学的に修飾された化合物であって、好ましくはエステラーゼなどの酵素による加水分解の結果として患者の体内で該化合物の生物学的に活性な形態が放出されるものと定義される。

「アルキル」とは、メチル、エチル、イソブチル（i-Bu）、シクロヘキシル、t-ブチル（t-Bu）などの直鎖、分枝鎖または環状飽和炭化水素残基として通常の意味を有する。本発明のアルキル置換基は示した炭素数のものであって、1または2の置換基で置換されていてもよい。置換基は一般に該化合物の活性を妨害しないものであって、ヒドロキシル、CBZO-、CBZNH-、アミノなどが含まれる。アリールとは、フェニル、ナフチル、ピリジル、キノリル、インドリルなどの芳香族環系をいう。アリールアルキルとは、指示した位置にアルキル残基を介して結合したアリール残基をいう。いかなる場合においても、アリール部位は置換されていても置換されていなくてもよい。「アシル」とは、式：

$RCO-$ （式中、Rは上記アルキルまたはアリールアルキル）で示される置換基をいう。アリール基中の炭素数は一般に1～15である。しかしながら、アシル



置換基はインビボでは容易に加水分解されるので、該基の性質は比較的重要ではない。「環状アミン」とは、ピペリジンなどのように窒素がヘテロ環の一部を構成するアミンをいい、「ヘテロ環状アミン」とは、モルホリンなどのように別のヘテロ原子を含むヘテロ環をいう。B nはベンジル基 ( $\text{CH}_2\text{Ph}$ ) を、P i vはピバリル基 ( $\text{CO}-t-\text{Bu}$ ) を、 $\Phi$ はフェニル基をいう。

式(1)および(3)の化合物において、 $\text{R}^1$ および $\text{R}^2$ の好ましい態様には各 $\text{R}^1$ がHまたはメチル、 $\text{R}^2$ が3～8Cのアルキル、とりわけイソブチル、2-メチルブチル、またはイソプロピルであるものが含まれる。特に好ましいのはイソブチルである。(1)～(4)のすべての式において $n=1$ または $m=1$ である化合物もまた好ましい。

(1)～(4)のすべての式において、 $\text{R}^3$ の好ましい態様はHおよびメチル、とりわけHである。

$\text{R}^4$ は、メチレン基を介して該分子に結合した、融合したまたは共役した2環式芳香族系である。「融合したまたは共役した2環式芳香族系」とは、芳香族特性を有する2環式系であって、S、NまたはOなどの1または2以上のヘテロ原子をさらに含有していてもよいものを意味する。Nなどのヘテロ原子が含まれる場合には、該系は式(1)～(4)の一部を構成するものとして、該窒素に結合したアシル保護基(1～5C)を含有してよい。代表的な2環式融合芳香族系としては、ナフチル、インドリル、キノリニル、およびイソキノリニルが挙げられる。代表的な共役系としては、ビフェニル、4-フェニルピリミジル、3-フェニルピリジルなどが挙げられる。いずれの場合においても、該融合したまたは共役した2環系上のいずれの利用できる位置もメチレンを介した結合に用いることができる。融合したまたは共役した芳香族系は、1～2のアルキル(1～4C)残基および/またはヒドロキシでさらに置換されていてよく、いずれの環窒素もアシル化されていてよい。

$\text{R}^4$ の好ましい態様としては、1-(2-メチルナフチル)メチレン；1-キノリルメチレン；1-ナフチルメチレン；2-ナフチルメチレン；1-イソキノリルメチレン；3-イソキノリルメチレン；3-チオナフテニルメチレン；3-

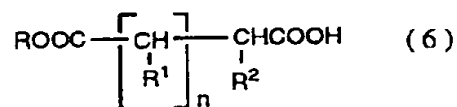
クマロニルメチレン；3-(5-メチルインドリル)メチレン；3-(5-ヒドロキシインドリル)メチレン；3-(2-ヒドロキシインドリル)メチレン；ビフェニルメチレン；および4-フェニルピリミジルメチレン；およびこれらの置換体が挙げられる。

これら置換基の多くは、アミノ酸残基の一部としてグリーンスタイン (Greenstein) およびウイニツ (Winitz) の「アミノ酸の化学 (Chemistry of the Amino Acids)」(1961) 3: 2731~2741 (ジョン・ウイリー&サンズ、ニューヨーク) に記載されている。

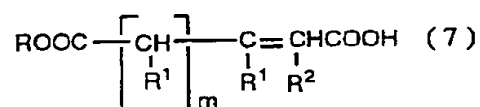
R<sup>4</sup>の特に好ましい態様は、3-インドリルメチレンまたはそのN-アシル誘導体、すなわち「C-末端」アミノ酸がトリプトファン残基またはその保護形態であるものである。R<sup>4</sup>が結合している炭素原子の好ましい立体配置はL-トリプトファンに対応するものである。

Xの好ましい態様は、式：NHR<sup>5</sup> (式中、R<sup>5</sup>はH、置換されたまたは非置換のアルキル(1~12C)またはアリールアルキル(6~12C))で示されるものである。R<sup>5</sup>上の特に好ましい置換基はヒドロキシ基、またはフェニルメトキシカルバミル(CBZNH-)残基である。加えて、Xも別のアミノ酸残基、とりわけグリシル残基(このものもまた上記のようにアミド化されてよい)である態様によって該化合物は伸長することができる。

一般に、ヒドロキサム酸エステルである化合物は、式：



または



(式中、RはHまたはアルキル(1~6C))で示されるカルボン酸またはエス

テル前駆体またはその活性形を、変換に有効な条件下でヒドロキシルアミンで処理することによってこれら化合物を対応するヒドロキサム酸エステルに変換する

ことによって得られる。

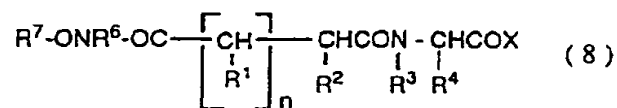
出発物質に関しては、 $-NR^3-CHR^4COX$  残基を形成する部分は、トリプトファンおよびその類似体の場合にはエステルまたはアミドとして容易に得られる。上記のように、多くの類似の融合した2環式芳香族アミノ酸がグリーンスタインおよびウイニツ（上記）によって記載されている。 $R^4$ が1-(2-メチルナフチル)メチレン；1-キノリルメチレン；1-ナフチルメチレン；1-イソキノリルメチレン；および3-イソキノリルメチレンであるものに対応するアミノ酸は、当該技術分野で理解されているように、アミノ酸のアセトアミドマロン酸エステル合成を用い、2環式芳香族メチレンハライドから調製することができる。メチレンハライド自体は、対応カルボン酸を水素化リチウムアルミニウムで還元し、得られたアルコールをチオニルブロマイドで臭素化することによって調製することができる。

一般に、ヒドロキシルアミン試薬は、ヒドロキシルアミン塩酸塩をメタノール中の過剰の $KOH$ と混合し、沈殿した塩化カリウムを濾取することによってその場で生成する。ついで、濾液を式(6)または(7)の前駆体活性化カルボン酸またはエステルとともに室温にて数時間攪拌し、ついで混合物を減圧下で蒸発乾固する。得られた残渣を酸性にし、ついで酢酸エチルなどの適当な有機溶媒で抽出し、抽出物を水性重硫酸カリウムおよび塩で洗浄し、ついで無水硫酸マグネシウムなどの固体乾燥剤で乾燥させる。ついで、抽出物を再び蒸発乾固し、結晶化させる。

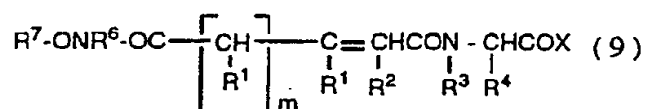
$-NHOR^7$ を含むヒドロキサム酸エステルの置換形態も同様の仕方で合成できるが、ヒドロキシルアミン自体の代わりに $H_2NOR^7$ （式中、 $R^7$ は低級アルキルまたはアシル（1～4C））を用いればよい。ついで、得られたO-アルキルまたはアシルヒドロキサム酸エステルを所望ならさらにアルキル化してカルボン酸の $R^7ONR^6-$ 誘導体を得ることができる。同様に、 $HNR^6OH$ をカルボン酸と反応させて $HONR^6-$ 誘導体を得ることができる。 $CH_3NHOH$ および

$H_2NOCH_3$ は市販されている。

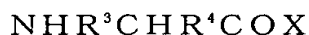
式(6)および(7)の出発物質を調製するため、式：



または



で示されるモノエステル化したカルボン酸を式：



(式中、XはOH以外である)で示される酸と、アミド結合が生成する条件下で反応させる。そのような条件は、一般に、塩基およびカルボジイミドなどの縮合剤の存在下での非水性無水極性非プロトン溶媒中の上記2つの成分の混合物からなる。それゆえ、アミド結合の生成は、カルボジイミド、たとえばジシクロヘキシルカルボジイミドやN,N-カルボニルジイミダゾールなどの標準脱水剤の存在下で触媒することができる。ついで、生成物を式(6)または(7)のジアステレオマーの混合物として回収する。この混合物はヒドロキサム酸エステルへの変換に用いるのが好ましく、得られたジアステレオマーのうちの一つを生成物の混合物から直接結晶化する。別法としては、ヒドロキサム酸エステルに変換する前にジアステレオマーをフラッシュクロマトグラフィーによって分離し、別々に回収する。この方法は、ジアステレオマーの分離を最終生成物が得られるまでとっておく方法に比べると好ましくない。

実施例に用いる表示において、「A」異性体はTLC上で一層速く移動するものとして定義される。「B」異性体は一層ゆっくりと移動するものである。融合した2環式芳香族環系を有する「L」形のトリプトファンまたは他のアミノ酸が残基として用いられ、R<sup>1</sup>がHである場合には、一般に「A」形態は、最終ヒドロキシ]サメート生成物中のR<sup>2</sup>置換基を有する炭素において対応する立体配置を有するものである。しかしながら、D-トリプトファンが組成物中に含まれる以

下の実施例2においては、「B」異性体は、式(1)の化合物中のR<sup>2</sup>を有する炭素において「L」立体配置に対応するものを有するであろう。

R<sup>6</sup>および／またはR<sup>7</sup>がアルキルである場合は、実施例1において非置換のヒドロキシルアミンについて行っているように、対応するO-またはN-アルキルヒドロキシルアミンをメチルエステル4Aと反応させる。別法として、メチルエステル4Aを対応カルボン酸にけん化し、オキサリルクロライドまたは他の縮合剤で活性化する。ついで、アルキルヒドロキシルアミンを活性化カルボン酸と反応させてO-またはN-置換ヒドロキサム酸を得る。O-およびN-メチルヒドロキシルアミンはアルドリッチ・ケミカル・カンパニーから購入することができる。

他のN-アルキルヒドロキシルアミンの合成は、脂肪族アルデヒドをそのオキシムに変換し、ついで6N HClの存在下、ボラン-ピリジン錯体でN-アルキルヒドロキシルアミンに還元することによって行うことができる(カワセ(Kawase, M.) およびキクガワ(Kikugawa, Y.)、Chem. Soc. Perkin Trans (1979) 1: 643)。他のO-アルキルヒドロキシルアミンの合成は、ロバーツ(Roberts, J. S.)の「ヒドロキシルアミンの誘導体(Derivatives of Hydroxylamine)」(6.4章、バートン(Barton, D.)ら編、Comprehensive Organic Chemistry (1979) 2: 187~188 (パーガモン・プレス、オックスフォード)中)に記載された一般法によって行うことができる。使用した2つの一般的な方法は、ヒドロキシルアミンスルホン酸またはクロロアミンからの脱離基のR<sup>7</sup>O-による置換、およびヒドロキサム酸のR<sup>7</sup>-XによるO-アルキル化とその後の加水分解である：



または

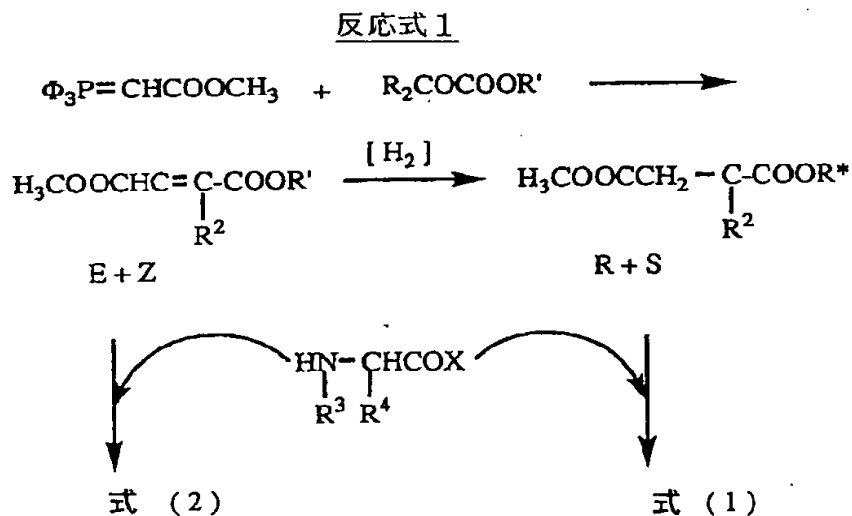


R<sup>7</sup>がアシルの場合は、本発明のヒドロキサム酸を酸クロライド、無水物または他のアシル化剤でアシル化してこのクラスの化合物を得ることができる。

幾つかの場合には、本発明の化合物の合成に必要な誘導体化マレイン酸およびコハク酸残基は市販されている。市販されていない場合には、これら化合物は、

R<sup>1</sup>がHまたはアルキル（1～8C）である態様において、式：R<sup>2</sup>COCOOR<sup>1</sup>で示される2-オキソカルボン酸エステルをウィティヒ反応においてトリフェニルホスホラニリデン酢酸アルキルまたはα-トリフェニル-ホスホラニリデンアルカン酸アルキルと反応させることにより容易に調製することができる。酢酸メチルおよびアルカン酸メチルが好ましいが、いかなる適当なエステルも用いることができる。この反応は、通常、室温にて非水性の非極性溶媒中で行う。得られる化合物は、式：ROOCCCR<sup>1</sup>=CR<sup>2</sup>COOR'（式中、RおよびR'はエステル化するアルキルまたはアリールアルキルアルコールの残基である）で示される。

式（7）で示される化合物が望ましい場合は、この生成物を適当なトリプトファンまたは類似誘導体と縮合させる。式（6）で示される化合物が望ましい場合は、この中間体を適当な触媒を用いて水素で還元する。R<sup>1</sup>がHまたはアルキル、nが1でmが0、R<sup>2</sup>がアルキルである態様を得るための反応式を以下の反応式1に示す。



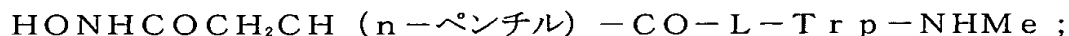
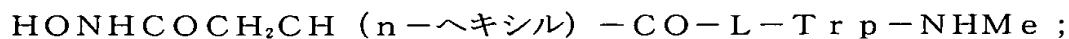
\* R' がベンジルである場合、水素化反応によってR' が除かれるであろう。

R<sup>1</sup>およびR<sup>2</sup>が一緒になって（CH<sub>2</sub>）<sub>n</sub>である場合の態様については、式：ROOCCHR<sup>1</sup>CHR<sup>2</sup>COOHで示される中間体を対応する1,2-シクロアルカンジカルボン酸、すなわち1,2-シクロペンタンジカルボン酸無水物；1,2-シクロヘキサンジカルボン酸無水物または1,2-シクロヘプタンジカルボン

酸無水物から調製する他は反応式1と同様の仕方で本発明の化合物を調製することができる。

—CONR<sup>3</sup>—が修飾された等配電子形態である化合物については、これら形態は当該技術分野で公知の方法により調製することができる。以下の文献には、これら代替結合残基を含むペプチド類似体の調製が記載されている：スパトラ (Spatola, A. F.)、Vega Data (1983年3月)、Vol. 1、第3刷、「ペプチド骨格修飾 (Peptide Backbone Modifications)」(概論)；スパトラ、「アミノ酸ペプチドおよびタンパク質の化学および生化学 (Chemistry and Biochemistry of Amino Acids Peptides and Proteins)」(1983) ウェインスタイン編、マーセル・デッカー、ニューヨーク、267頁(概論)；モリー (Morley, J. S.)、Trends Pharm Sci (1980) 463～468頁(概論)；ハドソン (Hudson, D.) ら、Int J Pept Prot Res (1979) 14: 177～185 (—CH<sub>2</sub>NR<sup>3</sup>—、—CH<sub>2</sub>CHR<sup>3</sup>—)；スパトラら、Life Sci (1986) 38: 1243～1249 (—CH<sub>2</sub>—S)；ハン (Hann, M. M.)、J Chem Soc Perkin Trans I (1982) 307～314 (—CH—CR<sup>3</sup>—、シスおよびトランス)；アームキスト (Almquist, R. G.) ら、J Med Chem (1980) 23: 1392～1398 (—COCHR<sup>3</sup>—)；ジェニングス—ホワイト (Jennings—White, C.) ら、Tetrahedron Lett (1982) 23: 2553 (—COCHR<sup>3</sup>—)；スゼルケ (Szelke, M.) ら、ヨーロッパ特許出願EP 45665号 (1982) CA: 97: 39405 (1982) (—CH(OH)CHR<sup>3</sup>—)；ホラディー (Holladay, M. W.) ら、Tetrahedron Lett (1983) 24: 4401～4404 (—C(OH)CH<sub>2</sub>—)；およびフルビー (Hruby, V. J.)、Life Sci (1982) 31: 189～199 (—CH<sub>2</sub>—S—)。

式(1)または(2)で示される好ましい化合物としては以下のものが挙げられる：



$\text{HONHCOCH}_2\text{CH (i-ペンチル) -CO-L-Trp-NHMe ;}$   
 $\text{HONHCOCH}_2\text{CH (エチル) -CO-L-Trp-NHMe ;}$   
 $\text{HONHCOCH}_2\text{CH (エチル) -CO-L-Trp-NHCH}_2\text{CH}_3 ;$   
 $\text{HONHCOCH}_2\text{CH (エチル) -CO-L-Trp-NHCH}_2\text{CH}_2\text{OH ;}$   
 $\text{HONHCOCH}_2\text{CH (エチル) -CO-L-Trp-NHシクロヘキシル ;}$   
 $\text{MeONHCOCH}_2\text{CH (iBu) -CO-L-Trp-NHEt ;}$   
 $\text{EtONMeCOCH}_2\text{CH (iBu) -CO-L-Trp-NHEt ;}$   
 $\text{MeONHCOCH}_2\text{CH (iBu) -CO-L-Ala (2-ナフチル) -NHEt ;}$   
 $\text{EtONMeCOCH}_2\text{CH (iBu) -CO-L-Ala (2-ナフチル) -NHEt ;}$   
 $\text{HONHCOCH}_2\text{CH (i-Bu) CO-L-Trp-NHMe ;}$   
 $\text{HONHCOCH}_2\text{CH (i-Bu) CO-L-N-MeTrp-NHMe ;}$   
 $\text{HONHCOCH}_2\text{CH (i-Bu) CO-L-Trp-NH (CH}_2)_2\text{OH ;}$   
 $\text{HONHCOCH}_2\text{CH (i-Bu) CO-L-Trp-NH (S) CHMePh ;}$   
 $\text{HONHCOCH}_2\text{CH (i-Bu) CO-L-Trp-NH (CH}_2)_6\text{NH-CBZ ;}$   
 $\text{HONHCOCH}_2\text{CH (i-Bu) CO-L-Ala (2-ナフチル) NHMe ;}$   
 $\text{HONHCOCH}_2\text{CH (i-Bu) CO-L-Trp-NH (CH}_2)_4\text{CH}_3 ;$   
 $\text{HONHCOCH}_2\text{CH (i-Bu) CO-L-Trp-ピペリジン ;}$   
 $\text{HONHCOCH}_2\text{CH (i-Bu) CO-L-Trp-NH (CH}_2)_{11}\text{CH}_3 ;$   
 $\text{HONHCOCH}_2\text{CH (i-Bu) CO-L-Trp-NHシクロヘキシル ;}$   
 $\text{HONHCOCH}_2\text{CH (i-Bu) -L-Trp-OH ;}$   
  
 $\text{HONMeCOCH}_2\text{CH (i-Bu) CO-L-Trp-NHMe ;}$   
 $\text{HONEtCOCH}_2\text{CH (i-Bu) CO-L-Trp-NHMe ;}$



$\text{CH}_3\text{COONHCOCH}_2\text{CH}(\text{i-Bu})\text{CO-L-Trp-NHMe}$  ;  
 $\Phi\text{COONHCOCH}_2\text{CH}(\text{i-Bu})\text{CO-L-Trp-NHMe}$  ;  
 $\text{CH}_3\text{COONMeCOCH}_2\text{CH}(\text{i-Bu})\text{CO-L-Trp-NHMe}$  ; お  
 よび  
 $\Phi\text{OCOONEtCOCH}_2\text{CH}(\text{i-Bu})\text{CO-L-Trp-NHMe}$  。

式(3)および(4)で示される逆ヒドロキサム酸エステルおよびヒドロキシ  
 尿素は、対応するヒドロキサム酸エステル自体に比べて生物学的に一層安定であ  
 る。このことは、カーター (Carter, G. W.) ら、J Pharmacol Exp Ther (1991) 256 : 929~937 ; ジャクソン (Jackson, W. P.) ら、J Med Chem (1988) 31 : 499~500 ; ヤング (Young, P. R.) ら、F A S F B J (1991) 5 : A1273 ; ハーン (Hahn, R. A.) ら、J Pharmacol Exp Ther (1991) 256 : 94~102 ; トランポッシュ (Tranposch, K. M.) ら、Agents Actions (1990) 30 : 443~450 ; アー  
 ジエンティーリ (Argentieri, D. C.) ら ; キンバル (Kimball, E.) ら、5th Int Conf Inflammation Research Assoc.、ホワイトヘブン、ペンシルベニ  
 ア、1990年9月23~27日、アブストラクト100 ; およびフアン (Huang, F.) ら、J Med Chem (1989) 32 : 1836~1842において確  
 認されている。それゆえ、合成は若干複雑ではあるが、これら類似体は、これら  
 化合物の治療への応用において有利な生理学的特性を付与する。

本発明の逆ヒドロキサム酸エステルおよびヒドロキシ尿素は、以下にさらに詳  
 細に記載するように、合成有機化学の標準法 (チャリス (Challis, B. C.) ら  
 、「アミドおよび関連化合物 (Amides and Related Compounds)」、「有機化  
 学総論 (Comprehensive Organic Chemistry)」、バートン (Barton, F.)  
 ら編 (1979) 2 : 1036~1045中) を用いて得ることができる。

出発物質に関しては、 $-\text{NR}^3-\text{CHR}^4\text{COX}$  残基を形成する部分は、トリプ  
 トファンおよびそのエステルの場合にはエステルまたはアミドとして容易に得る

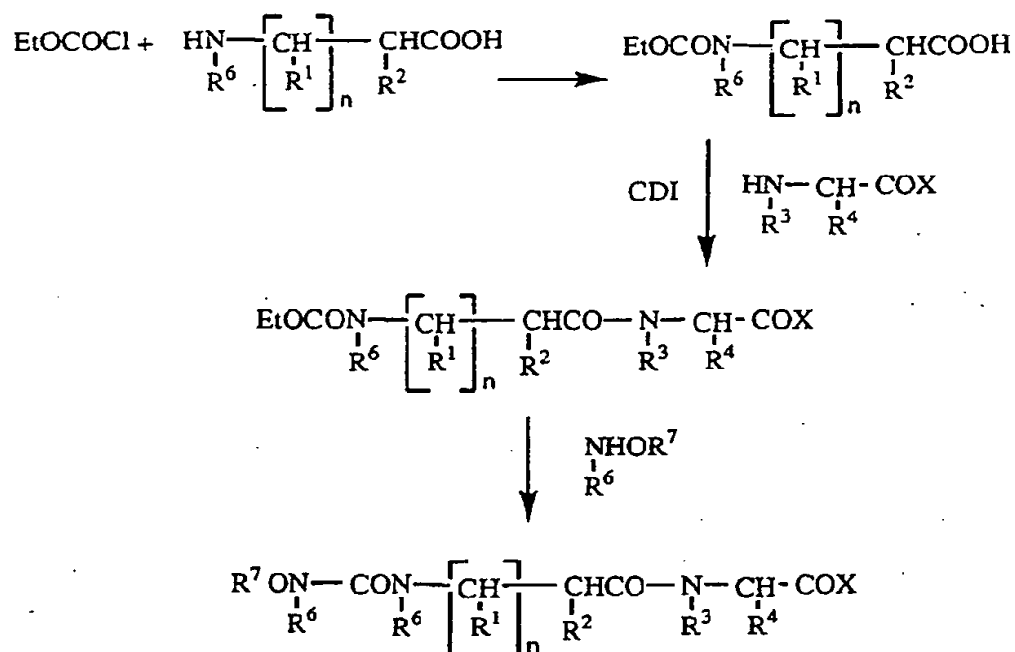
ことができる。上記のように、多くの類似の融合した2環式芳香族アミノ酸がグ  
 リーンスタインおよびウイニツ (上記) によって記載されている。R<sup>4</sup>が1-

(2-メチルナフチル)メチレン; 1-キノリル-メチレン; 1-ナフチルメチレン; 1-イソキノリルメチレン; および3-イソキノリルメチレンであるものに対応するアミノ酸は、当該技術分野で理解されているように、アミノ酸のアセトアミドマロン酸エステル合成を用い、2環式芳香族メチレンハライドから調製することができる。メチレンハライド自体は、対応するカルボン酸を水素化リチウムアルミニウムで還元し、得られたアルコールをチオニルブロマイドで臭素化することによって調製することができる。

Yで示される官能基に依存して、この残基を本発明の化合物中に導入する合成の段階は変わる。

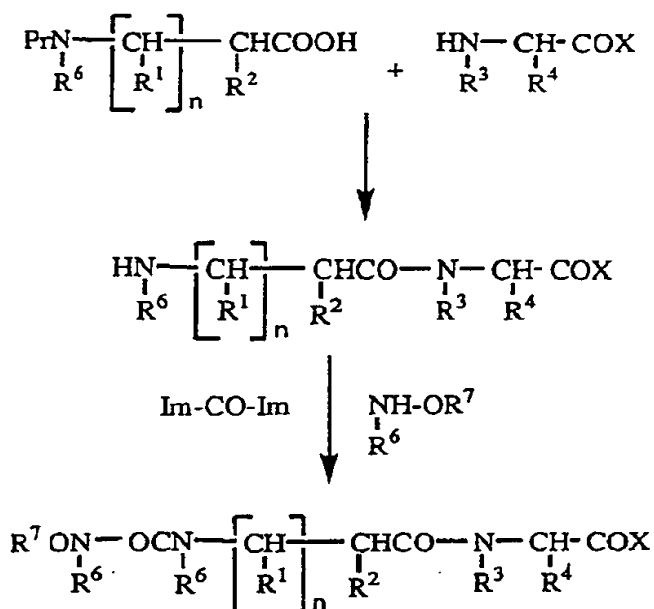
Yが $R^7ONR^6CONR^6-$ であり、nが0、1または2である態様については、これら化合物の調製は、フィーザー (Fieser, L. F.) らの「有機合成の試薬 (Reagents for Organic Synthesis)」(1967) 1: 479 (ジョン・ウイリー&サンズ、ニューヨーク) に記載されているように、 $\alpha$ 、 $\beta$ または $\gamma$ アミノ酸をそれぞれクロロギ酸メチルまたはクロロギ酸エチルでアシル化し、得られたアミノ酸を残基 $-NR^3CHR^4COX-$ の保護形態と縮合させ、ついで得られたカルボエトキシ「ジペプチド」をヒドロキシルアミンまたは置換ヒドロキシルアミンと反応させることによって行う。この反応手順は、反応式1Aに示してある。

## 反応式 1 A



別法として、上記 $\alpha$ 、 $\beta$ または $\gamma$ アミノ酸をたとえばカルボベンゾキシまたは $t$ -ブチルオキシカルボニルを用いて一時的に保護し、これを $\text{R}^1$ を含有するカルボキシ末端を保護したアミノ酸残基とカップリングさせることもできる。ついで、保護基を水素化分解または酸分解により適当に除去し、ついで脱保護した $\alpha$ 、 $\beta$ または $\gamma$ アミノ基をカルボニルジイミダゾールなどの活性化炭酸と反応させる。ついで、得られた生成物をヒドロキシルアミンまたは置換ヒドロキシルアミンと反応させて所望の生成物を得る。この反応の手順を反応式2にまとめて示す(式： $\text{Im-CO-Im}$ 中、 $\text{Im}$ はイミダゾール残基を示す)。

## 反応式 2



適当な $\alpha$ 、 $\beta$ または $\gamma$ アミノ酸の調製は、ジョーンズ (Jones, J. H.) らの「アミノ酸 (Amino Acids)」、834頁 (バートンら編) (「有機化学総論 (Comprehensive Organic Chemistry)」(1979) Vol. 2、パーガモン・プレス) に記載された一般法により行う。そのような方法としては、たとえば、対応するN-保護 $\alpha$ -アミノ酸のアルトーアイステルト合成による同族体生成 (homologation) およびより一般的にはフタルイミドなどの窒素求核試薬の $\alpha$ 、 $\beta$ -不飽和エステル、酸またはニトリルへの付加が挙げられる。

ヒドロキシ尿素の第二のクラスにおいて、Yは式： $\text{R}^6\text{NCONOR}^7$ を有し、nは0、1または2である。これら化合物は、式： $\text{R}^7\text{ONH}(\text{CHR}^1)$ 。 $\text{CHR}^2\text{COOH}$ で示される対応 $\alpha$ 、 $\beta$ または $\gamma$ ヒドロキシアミノ酸から調製する。両方の $\text{R}^6$ がHである場合は、フィーザーおよびフィーザーの「有機合成の試薬 (Reagents for Organic Synthesis)」(1968) 1:479 (ジョン・ウイリー&サンズ、ニューヨーク) に記載されているように、四イソシアネートケイ素と反応させることにより、この中間体を所望のヒドロキシ尿素に変換する。反応は、保護されたまたは $\text{R}^7$ で置換されたヒドロキシル基を用いて行う。ついで、得られたヒドロキシ尿素を式： $\text{HNR}^3\text{CHR}^4\text{COX}$ で示される部分とカップリングさせて所望の生成物を得る。別法として、アミドをまず生成させ

N-ヒドロキシジペプチドを試薬と反応させる。

別法として、Yが $R^6HNC O-NOR^7$  (式中、 $R^6$ はアルキル) である場合は、上記O-保護した $\alpha$ 、 $\beta$ または $\gamma$  N-ヒドロキシアミノ酸を関連するアルキルイソシアネート $R^6NCO$ と反応させて所望の生成物を得る。

Yが式： $R^6_2NCONOR^7-$  (式中、両方の $R^6$ はアルキル) で示される場合は、 $\alpha$ 、 $\beta$ または $\gamma$  N-ヒドロキシアミノ酸を炭酸の活性形、たとえばカルボニルジイミダゾールまたはビス-p-ニトロフェニルカーボネートと反応させ、ついでジアミン $R^6_2NH$  (式中、両方の $R^6$ はアルキル) と反応させる。ついで、所望なら脱保護する。

上記条件は、ニシノ (Nishino, N.) らの Biochemistry (1979) 18 : 4340~4346 に記載されているように、トリペプチドの同様の調製の記載においても適用しうる。

上記合成において中間体として用いる $\beta$ -N-ヒドロキシアミノ酸はマロン酸エステル合成によって調製することができ、その際、マロン酸ジエチルを2回、一つは $R^2-Br$ で、ついでベンジルクロロメチルエーテル (たとえば、 $R^1$ がHである場合) でアルキル化する。この生成物を、コーチルウィッツらの Biochemistry (1984) 23 : 2083~2087 に記載された同族アルデヒドの合成と同様の仕方で、けん化し、脱炭酸し、水素化し、ついで酸化して $\beta$ -アルデヒドを得る。ついで、保護した (または $R^7$ がアルキルの場合はアルキル化した、または $R^7$ がアシルの場合はアシル化した) ヒドロキシルアミンを付加することにより、所望の $\beta$ -ヒドロキシアミノ酸が得られる。 $R^1$ がアルキルである対応化合物は、第二のアルキル化をベンジル $-O-CH R^1C I$ を用いて行って同様の仕方で調製することができる。同族体のケトン $\beta$ はガラディー (Galardy, R. E.) らの Biochemistry (1985) 24 : 7607~7612 に記載されている。

最後に、Yが式： $R^6CONOR^7-$ 、すなわち逆ヒドロキサム産エステルである化合物は、対応する $\alpha$ 、 $\beta$ または $\gamma$  N-ヒドロキシジペプチドをアシル化する

ことによって調製することができる。別法として、N-ヒドロキシアミノ酸をアシル化し、ついで縮合して本発明の化合物のアミド結合を生成することができる。アシル化法は、たとえば、ニシノらの Biochemistry (1979) 18: 4340~4346 (上記で引用) に記載されている。

別法として、nが1、R<sup>1</sup>がHである化合物については、該化合物の調製は、トリフェニルホスフィンおよび1,1-ジメトキシ-2-ブロモエタンから調製したイリド1,1-ジメトキシ-2-(トリフェニルホスホラニリデン)を4-メチル-2-オキソペンタン酸と縮合することにより行うことができる。ついで、生成物を水素化して4,4-ジメトキシ-2-イソブチルブタン酸を得、これを残基R<sub>3</sub>NHCHR<sub>4</sub>COXとカップリングして4,4-ジメトキシ-2-イソブチルブタノイル-NR<sup>3</sup>CHR<sup>4</sup>COXを得る。酸水溶液で処理するとアルデヒドの2-イソブチル-4-オキソブタノイル-NR<sup>3</sup>CHR<sup>4</sup>COXが得られる。ヒドロキシルアミンと反応させてオキシムを調製し、還元して対応するN-置換ヒドロキシルアミンとする。ヒドロキサミノールの酸素および窒素の両方をアシル化し、ついでO-アシル基を加水分解してN-アシル逆ヒドロキサム酸エステルを得る (サマーズ (Summers, J. B.) ら、J Med Chem (1988) 31: 1960~1964)。

-CONR<sup>3</sup>-が修飾した等配電子の形態である化合物については、これらの形態は上記当該技術分野で公知の方法により調製することができる。式(3)および(4)で示される好ましい化合物としては、以下のものが挙げられる：

EtONHCONMe-CH<sub>2</sub>CH(iBu)-CO-L-Trp-NHEt；

EtCONOH-CH<sub>2</sub>CH(iBu)-CO-L-Trp-NHEt；

n-PrCONOEt-CH<sub>2</sub>CH(iBu)-CO-L-Trp-NHEt；

EtNHCONOMe-CH<sub>2</sub>CH(iBu)-CO-L-Trp-NHEt；

MeNHCONOH-CH<sub>2</sub>CH(iBu)-CO-L-Trp-NHEt；

EtONHCONMe-CH<sub>2</sub>CH(iBu)-CO-L-Ala(2-ナフチル)-NHEt；

EtCONOH-CH<sub>2</sub>CH(iBu)-CO-L-Ala(2-ナフチル)-

NHEt ;

n-PrCONOEt-CH<sub>2</sub>CH(iBu)-CO-L-Ala (2-ナフチル) -NHEt ;

EtNHCONOMe-CH<sub>2</sub>CH(iBu)-CO-L-Ala (2-ナフチル) -NHEt ;

MeNHCONOH-CH<sub>2</sub>CH(iBu)-CO-L-Ala (2-ナフチル) -NHEt ;

HONHCONHCH<sub>2</sub>CH(iBu)-CO-L-TrpNHMe ;

HONHCONHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH(iBu)-CO-L-TrpNHMe ;

HONHCONHCH(iBu)CO-L-TrpNHMe ;

H<sub>2</sub>NCON(OH)CH(iBu)CO-L-TrpNHMe ;

HN(OH)CH<sub>2</sub>CH(iBu)CO-L-TrpNHMe ;

H<sub>2</sub>NCON(OH)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH(iBu)CO-L-TrpNHMe ;

CH<sub>3</sub>CON(OH)CH(iBu)CO-L-TrpNHMe ;

CH<sub>3</sub>CON(OH)CH<sub>2</sub>CH(iBu)CO-L-TrpNHMe ; および

CH<sub>3</sub>CON(OH)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH(iBu)CO-L-TrpNHMe。

#### 投与および使用

上記背景の記載において示したように、過剰または望ましくない間質破壊性のメタロプロテアーゼ活性によって媒体される多数の疾患が知られている。それゆえ、本発明の化合物は、かかる疾患の治療または予防のために適用することができる。これら疾患には、腫瘍転移、慢性関節リウマチ、皮膚炎症、とりわけ角膜または口の潰瘍形成、感染への反応などが含まれる。本発明の抑制剤によって治療することが可能な疾患の定義に包含されるものとして、創傷、好ましくは慢性の皮膚創傷が挙げられる。しかしながら、本発明の抑制剤は、たとえば、じよく瘡性潰瘍、口の潰瘍を含むあらゆる潰瘍性の皮膚状態、または創傷の快癒がゆっくりとしている他の状態においても有用である。それゆえ、本発明の化合物は、このような望ましくない活性が関与する状態に関する治療において有用である。

本発明の化合物は、乾せんの治療または予防にとりわけ有用である。乾せんは

、ある種の病因の一般的な炎症性皮膚疾患であり、顕著な表皮過形成、混合炎症性

浸潤物および血管変性を特徴とする。乾せんおよび他の皮膚疾患における表皮過形成の分子機構は未だ解明されていない。しかしながら、種々の増殖因子、サイトカインおよび癌原遺伝子が、細胞外環境からの増殖促進シグナルの表皮ケラチノサイト中への導入に関係があるとされている。乾せんおよび他の過増殖性皮膚疾患の現在の治療法としては、種々の局所性ステロイド剤、表皮剥脱、全身性化学療法および紫外線暴露が挙げられる。しかしながら、これら利用できる療法は毒性並びにタキフィラキシーによって限界がある。

本発明の間質メタロプロテアーゼ抑制剤、とりわけコラゲナーゼ抑制剤に応答性の他の状態としては、血管形成術の後の再発狭窄症が挙げられる。健康な動脈壁は、線維芽細胞の外膜層、平滑筋細胞の中央の中間層および内皮細胞の内腔血管内膜層から構築されている。気球血管形成術後の再発狭窄症の一つの原因は、血管内膜の破壊を引き起こす平滑筋細胞によるコラゲナーゼの産生および放出であることが提案されている（サウスゲート（Southgate, K.M.）ら（1992）Bichem, J、288：93～99）。このことが、今度は平滑筋細胞の血管内膜への移行を容易にし、そこで平滑筋細胞は増殖を続け、再発狭窄症の特徴である線維状のプラークを形成する。それゆえ、本発明の間質メタロプロテアーゼ抑制剤は、血管形成術の前または後に投与した場合に再発狭窄症を予防または抑制する。

本発明の間質メタロプロテアーゼ抑制剤のたの適用は、癌、とりわけ転移性および浸潤性癌の治療または予防である。癌細胞は、血液中への管外遊出、およびそれに続く血液から標的器官への管外遊出によって原発部位から遠位の第二の部位へ移行する。それゆえ、癌細胞の管外遊出を制御することができるならば転移を予防または排除することが可能となる。管外遊出において鍵となるプロセスが癌細胞によって分泌される酵素、とりわけコラゲナーゼによる細胞外間質の破壊であるので、本発明のコラゲナーゼ抑制剤は癌の治療または予防ニ対して有意の適用性を有する。



上記のように、本発明のコラゲナーゼ抑制剤は、たとえば、じよく瘡性潰瘍、口の潰瘍、または創傷の快癒がゆっくりとしている他の状態を含む潰瘍性の皮膚

状態において有用である。本発明の化合物によって治療しうる同様の状態としては、角膜軟化症、強膜軟化症に伴う角膜または強膜の溶解、貫通および結合組織疾患が挙げられる。後者の例は、角膜の薄化 (thinning) および中央隆起に關与する円錐角膜がある。IV型コラゲナーゼは、少なくとも部分的には該疾患の原因であると考えられる。

哺乳動物のメタロプロテアーゼの合成抑制剤である化合物は、血管形成を抑制するのに有用である。それゆえ、これら化合物は、望ましくないレベルの血管増殖を特徴とする状態において血管形成を抑制するのに用いるための医薬組成物に調合することができる。

本発明の間質メタロプロテアーゼ抑制剤、とりわけコラゲナーゼ抑制剤に応答性の他の状態としては、たとえば循環血液量減少性ショックおよび敗血症性ショックを含むショックが挙げられる。循環血液量減少性ショックなどの多くの疾患のメカニズムは複雑であり、複數ノ原因の結果である。従って、本明細書において使用する「治療」とは、1または2以上の原因または事象を妨害し、それによって、治療すべき個体に有利な影響を及ぼす方法をいう。循環血液量減少性ショックを「治療する」とは、おそらく実際にはショックの原因を完全には除くことなく、兆候の開始を予防し、遅延させ、または如何ようにかして減少させることを含む。従って、本発明の組成物で治療すれば、個体は最終的にはショックに屈服するとしても、その生命を延ばし、および／または生命の質を高めることができる。

本発明の組成物はまた、該疾患を発症するハイリスクにある患者においてかかるショックの予防にも適用することができる。たとえば、出血、緑内障、火傷、多尿、嘔吐および下痢を含むある種の状態は、循環血液量減少性ショックを発症するハイリスクを有する。Circulatory Shock (1992) 91:7 参照。それゆえ、これら状態の一つのために入院している患者は、循環血液量減少性ショックの発症を予防するために本発明の組成物を投与することができる。従って、

本特許出願を通して循環血液量減少性ショックの治療方法に言及しているが、かかる方法はショックの治療法をも包含することが当業者によって理解されるであろう。

う。

Remington's Pharmaceutical Sciences (マック・パブリッシング・カンパニー、イーストン、ペンシルベニア、最新版) に記載されているものなどの標準医薬調合法を用いることができる。

全身治療のための適応症には、本発明の化合物を注射または経口投与するのが好ましい。これら状態としては、腫瘍増殖および転移が挙げられる。生理食塩水、ハンク液 (Hank's solution)、リンゲル液などの注射目的のために通常用いる賦形剤を用い、本発明の化合物を注射用に調合することができる。注射は、静脈内、筋肉内、腹腔内または皮下であってよい。投与量レベルは、もちろん、状態の性質、患者の性質、選択した本発明の化合物の特定の態様、および調合物の性質および投与経路に応じて  $0.1 \text{ mg/kg}$  患者から  $100 \text{ mg/kg}$  患者のオーダーである。

注射による投与に加えて、本発明の化合物はまた、これら組織の浸透に影響を及ぼす剤、たとえば胆汁酸塩、フシジン酸誘導体、コール酸などを含有させることにより経皮または経粘膜送達用の組成物に調合することもできる。本発明の組成物はまた、治療すべき状態の性質に応じて、リポソームに基づくデリバリーシステムとして、および局所および経口投与用調合物として用いることができる。経口投与は、残基  $-CONR^3-$  が修飾された等配電子の形態である化合物またはプロドラッグの形態に特に有利である。これら化合物は、消化管の加水分解作用に対して抵抗性である。経口調合物としては、シロップ剤、錠剤、カプセル剤などが挙げられ、化合物はまた食物もしくはジュース中にて投与することができる。

本発明の抑制剤は、ターゲティングリガンドを用いることにより、血管新生の生じた特定の部位にターゲティングすることができる。たとえば、本発明の化合物を腫瘍に集中させるため、イムノトキシンの調製において一般に理解されてい

るように腫瘍マーカーに対して免疫反応性の抗体またはその断片に抑制剤を結合させる。ターゲティングリガンドはまた、腫瘍中に存在するレセプターに適したリガンドであってもよい。意図する組織のマーカーと特異的に反応するターゲティング

ングリガンドであればいずれも使用できる。本発明の化合物をターゲティングリガンドに結合させる方法は当該技術分野で知られており、担体にカップリングさせるための以下に記載する方法と同様である。得られたコンジュゲートは調合し、上記のようにして投与する。

局在性の状態に対しては局所投与が好ましい。たとえば、糖尿病によって誘発された網膜症または血管新生性緑内障を治療するには、罹患した目への直接適用に点眼剤または軟膏剤またはゲル剤またはエアロゾル剤として調合物を用いる。この処置のため、本発明の化合物をゲル剤または軟膏剤として調合することもできるし、またはコラーゲンまたは親水性ポリマーシールド中に導入することもできる。該物質はまた、コンタクトレンズまたは貯蔵体 (reservoir) として、または結膜下調合物として挿入することもできる。

上記態様のすべてにおいて、もちろん、本発明の化合物は単独または混合物として投与することができ、組成物にはさらに適応症に適した別の薬剤または賦形剤を含有させることができる。

それゆえ、血管形成の抑制によって利益を受ける状態としては、一般に、血管肉腫、カポジ肉腫、多形性膠芽腫、血管芽腫、フォン・ヒッペル・リンドウ病および血管周囲細胞腫；糖尿病性網膜症および血管新生性緑内障などの目の状態；慢性関節リウマチ、好酸球増加症を伴う血管リンパ球過形成などの免疫系の状態；および海綿状血管腫（カサバツハーメリット症候群を含む）および乾せんなどの皮膚状態が挙げられる。

以下の実施例は、本発明を説明するものであるが、本発明を限定するものではない。これら実施例は、本発明のある種の化合物の調製および哺乳動物のメタロプロテアーゼを抑制する活性を記載するものである。

以下の実施例において、TLC溶媒系は以下の通りである：（A）酢酸エチル

／メタノール（95：5）；（B）酢酸エチル／メタノール（25：5）；（C）酢酸エチル；（D）酢酸エチル／メタノール（30：5）；（E）酢酸エチル／ヘキサン（1：1）；（F）クロロホルム／メタノール／酢酸（30：6：2）；（G）クロロホルム／メタノール／酢酸（85：10：1）。

### 実施例 1

#### N-[D, L-2-イソブチル-3-(N'-ヒドロキシカルボニルアミド)- プロパノイル]-トリプトファンメチルアミドの製造

無水ジメチルホルムアミド10ml中の4-メチル-2-オキシ吉草酸のナトリウム塩5g(0.033mol)および臭化ベンジル5.65g(0.033mol)の懸濁液を、室温で4日間攪拌した。溶媒を減圧下で蒸発させた後、残渣をヘキサンで100mlまで希釈し、水(3×20ml)および飽和塩化ナトリウムで洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させた。溶媒の蒸発により、4-メチル-2-オキシ吉草酸のベンジルエステル(1)6.4g(収率88%)が無色油状物として得られた。

乾燥塩化メチレン100ml中の(1)6.4g(0.029mol)およびメチル-(トリフェニルホスホラニリデン)酢酸9.7g(0.029mol)の混合物を12時間室温で攪拌し、蒸発乾燥した。残渣をヘキサン(3×50ml)で抽出した。ヘキサン溶液を10%炭酸水素ナトリウム(2×30ml)、水および飽和塩化ナトリウムで洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させた。溶媒の蒸発により、2-イソブチル-3-(メトキシカルボニル)-吉草酸ベンジル(2)8.01g(収率100%)が、EおよびZ異性体の混合物として得られた。

メタノール50ml中の(2)8.01g(0.029mol)および10%パラジウム-炭素1gの混合物を、室温で4気圧の水素ガスの下8時間水素添加した。触媒を濾過して除いた後、濾液を減圧下蒸発乾燥し、2-イソブチル-3-(メトキシカルボニル)-吉草酸(3)4.7g(収率86%)を無色油状物として得た。

乾燥塩化メチレン10ml中の(3)0.85g(4.5mmol)および塩化オキザリル0.57g(4.5mmol)の混合物に、無水ジメチルホルムアミド0.1mlを添加した。1時間室温で攪拌した後、溶媒を減圧下蒸発させ、残渣を無水ジメチルホルムアミドで5mlまで希釈し、L-トリプトファンメチルアミドの塩酸塩1.06

g (4.1 mmol) (コルチレビッツおよびガラーディ、J. Med. Chem. (1990) 33 : 263-273) を加え、続いてトリエチルアミン 1.3 ml (9.3 mmol) を -10 °C で加えた。これを室温で7時間攪拌し、室温で減圧下蒸発乾燥した。残渣を酢酸エチルで150 ml まで希釈し、水 (2 × 15 ml)、10 % 硫酸水素カリウム (5

× 20 ml)、10 % 炭酸水素ナトリウム (2 × 20 ml)、飽和塩化ナトリウムで洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥し、次いで蒸発して、N-[D, L-2-イソブチル-3-(メトキシカルボニル)-プロパノイル]-L-トリプトファンメチルアミド 4 1.6 g (収率 83 %) がジアステレオマー 4 A および 4 B の混合物として得られた。

異性体 4 A および 4 B はフラッシュクロマトグラフィー (シリカゲル、酢酸エチル) により分離した。

異性体 4 A : mp = 134 - 137 °C。R<sub>f</sub>(C) = 0.37。

異性体 4 B : mp = 156 - 158 °C。R<sub>f</sub>(C) = 0.2。

別法として、4 A および 4 B の混合物を下記のように直接そのヒドロキサマー トに変換した。この場合、5 A が 5 A および 5 B の混合物から結晶化した。

メタノール 1 ml 中の水酸化カリウム 0.22 g (3.96 mmol) の暖かい混合物を、ヒドロキシルアミンの塩酸塩 0.184 g (2.65 mmol) の暖かい混合物に加えた。アルゴン雰囲気下水中で冷却した後、塩化カリウムを濾取し、(4 A) 0.5 g (1.32 mmol) を濾液に加えた。得られた混合物を7時間室温で攪拌し、減圧下蒸発乾燥した。残渣を酢酸エチル 100 ml に懸濁し、10 % 硫酸水素カリウム 10 ml、飽和塩化ナトリウムで洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥し、減圧下蒸発乾燥した。残渣を酢酸エチルから結晶化させ、純粋 5 A 0.28 g (収率 56 %) を得た。

異性体 4 B を、4 A について記載したように、対応するヒドロキサム酸 5 B (収率 72 %) に変換した。

異性体 5 A : mp = 176 - 182 °C。R<sub>f</sub>(C) = 0.45。

異性体 5 B : mp = 157 - 162 °C。R<sub>f</sub>(C) = 0.39。

4 A/4 B混合物を使用する場合、5 Aが上記のように直接残渣から結晶化できる。

上記と類似の方法で、4-メチル-2-オキシ吉草酸、2-オキシ吉草酸、3-メチル-2-オキシ酪酸、2-オキシヘキサン酸、5-メチル-2-オキシヘキサン酸または2-デカン酸に変えることにより、対応する式1(ここで、R<sup>1</sup>は

HおよびR<sup>2</sup>はそれぞれn-プロピル、i-プロピル、n-ブチル、2-メチルブチルおよびn-オクチル)で示される化合物が製造される。加えて、上記に記載の実施例1の方法に従って、ウィッティヒ反応で得られた中間体の水素添加の工程を省いて、対応する式2(ここで、R<sup>1</sup>はHおよび、R<sup>2</sup>は上記)で示される化合物が得られる。

インドリル残基のアシル化形を含む化合物の合成のために、式3または4の中間体エステルを、ヒドロキサム酸に変換する前に、脱エステル化しアシル化する。説明のために、4 Aをエタノール中の水酸化ナトリウムで脱エステル化し、次いで酸性にし、N-(L-2-イソブチル-3-カルボキシプロパノイル)-L-トリプトファンメチルアミドを得、それをアルキル(1-4 C)カルボン酸無水物で処理し、N-(L-2-イソブチル-3-カルボキシイロプロパノイル)-L-((N-アシル)インドリル)-トリプトファンメチルアミドを得る。この中間体を、次いで塩化オキザリル、続いてヒドロキシルアミンで、低温で処理し、対応するヒドロキサメートを得る。

## 実施例2

### N-[2-イソブチル-3-(N'-ヒドロキシカルボニルアミド)- プロパノイル]-D-トリプトファンメチルアミド(7 B)の製造

N-[2-イソブチル-3-(メトキシーカルボニル)-プロパノイル]-D-トリプトファンメチルアミド6 A、Bの2つのジアステレオ異性体の混合物を、実施例1で4 A、Bについて記載のように製造した。混合物を酢酸エチルから結晶化し、2回の再結晶の後、純粋なジアステレオマー6 B 0.26 g (49%)が得られた：mp 155-157°C、R<sub>f</sub>(C)=0.32。6 Bを実施例1に記載の方法により、そのヒドロキサム酸7 Bに、収率50%(119mg)で変換した：mp 15

7-159°C、 $R_f(D)=0.39$ 。

### 実施例3

N-[2-イソブチル-3-(N'-ヒドロキシアミドカルボニル)-  
プロパノイル]-N-メチル-L-トリプトファンメチルアミド(9A)の製造  
N-メチル-L-トリプトファンメチルアミドを、実施例1でL-トリプトフ  
ア

ンメチルアミドについて記載しているのと同様に製造し、4について記載してい  
るように3と反応させ、粗N-[D, L-2-イソブチル-3-(メトキシカルボ  
ニル)-プロパノイル]-N-メチル-L-トリプトファンメチルアミド8A、B  
を得、それを酢酸エチルから結晶化し、8A 76mg(収率19%)を得た：mp 17  
1-174°C、 $R_f(C)=0.40$ 。

### 実施例4

N-[2-イソブチル-3-(N-ヒドロキシアミドカルボニル)-  
プロパノイル]-L-3-(2-ナフチル)-アラニンメチルアミド(11A)の製造  
N-[D, L-イソブチル-3-(メトキシカルボニル)-プロパノイル]-L-  
3-(2-ナフチル)-アラニン10Aを実施例1でL-3-(2-ナフチル)-ア  
ラニンメチルアミドおよび3について記載しているように製造した。粗生産物を  
酢酸エチル：ヘキサン1：1のシリカゲル60gのクロマトグラフィーに付し、  
10A 12mg(収率5%)を得た：mp 151-158°C、 $R_f(C)=0.69$ 。

10Aをヒドロキサメート11Aに実施例1に記載のように、30%の収率(  
3mg)で変換した：mp 179-181°C、 $R_f(D)=0.17$ 。MS-FAB( $m/z$ ) 400 ( $M^+ + H$ )。

### 実施例5

N-2-イソブチル-3-(N'-ヒドロキシアミドカルボニル)-プロパノイル]  
-L-トリプトファン-2-ヒドロキシエチルアミド(13A)の製造  
3を1, 1'-カルボニルイミダゾールで20分間塩化メチレン中室温で活性化  
した以外、実施例1でL-トリプトファンメチルアミドの塩酸塩について記載し  
ているように、L-トリプトファン-2-ヒドロキシーエチルアミドの塩酸塩を

製造し、3と結合させた。粗生産物はジアステレオ異性体12A、B 0.7 g (収率67%)の混合物であった： $R_f(C)$  12A 0.38、 $R_f(C)$  12B 0.19。

12Aが酢酸エチルから、収率35%(0.18 g)で結晶化した： $mp$  161-163°C、 $R_f(C)$  = 0.38。

12AをN-[2-イソブチル-3-(N'-ヒドロキシアミドカルボニル)-プロパノイル]-L-トリプトファン2-ヒドロキシエチルアミド13Aへ、実施

例1のように、収率35%(62 mg)で変換した： $R_f(D)$  = 0.17、 $mp$  162-163°C。MS-FAB ( $m/z$ ) 419 ( $M^+ + H$ )。

#### 実施例6

##### N-[2-イソブチル-3-(N'-ヒドロキシアミドカルボニル)-プロパノイル]-L-トリプトファンアミルアミド(15A)の製造

L-トリプトファンアミルアミドの塩酸塩を、実施例1でL-トリプトファンメチルアミドについて記載のように製造し、ジクロロメタン中、室温で20分1, 1'-カルボニルジイミダゾールで活性化した3と反応させた。N-[D, L-2-イソブチル-3-(メトキシカルボニル)-プロパノイル]-L-トリプトファンアミルアミド14A、B (収率90%)の2個のジアステレオマーの混合物を、4Aについて記載したように、対応するヒドロキサム酸に変換した。酢酸エチル溶液のゆっくりした蒸発により、15A、B 0.343 g (71%)が得られた： $mp$  160-163°C。MS-FAB ( $m/z$ ) 445 ( $M^+ + H$ )。

#### 実施例7

##### N-[2-イソブチル-3-(N'-ヒドロキシアミドカルボニル)-プロパノイル]-L-トリプトファンピペリジンアミド(17A、B)の製造

L-トリプトファンピペリジンアミドを、L-トリプトファンメチルアミドについて実施例1で行ったように3と反応させ、N-[D, L-2-イソブチル-3-(メトキシカルボニル)-プロパノイル]-L-トリプトファンピペリジンアミド16A、B 1.14 g (収率89%)を泡状物として得た： $R_f(C)$  = (16A) 0.74、(16B) 0.67。

16A、Bを実施例1の4Aと同様にして粗17A、Bに、収率88%(57



0 mg)で変換した： $R_f(D)$  (17A) 0.41、(17B) 0.30。粗17A、Bを、シリカゲル180 gで酢酸エチル中の12%イソプロパノールのクロマトグラフィーに付し、酢酸エチルから結晶化した後、17A、B 140 mg (収率25%)を得た： $mp$  169–170°C。MS-FAB ( $m/z$ ) 443 ( $M^+ + H$ )。

#### 実施例8

N-[2-イソブチル-3-(N'-ヒドロキシアミドカルボニル)-

プロパノイル]-L-トリプトファンデシルアミド(19A)の製造

L-トリプトファンデシルアミドの反応物を、実施例1のL-トリプトファンエンチルアミドについての記載と同様の方法で製造した。本エステルを実施例1に記載のように3と反応させ、収率93%で粗N-[D, L-イソブチル-3-(メトキシカルボニル)-プロパノル]-L-トリプトファンデシルアミド18A、Bを、18Aと18Bの混合物として得た。本混合物をシリカゲル150 gで酢酸エチル：ヘキサン1：2のクロマトグラフィーに付し、2個の異性体の混合物0.62 gを産生した： $R_f(E)$  18A 0.37、 $R_f(E)$  18B 0.29。

酢酸エチルからのゆっくしりた蒸発による結晶化により、TLCおよびNMR分析により、約10%の18Bが混入した18A 0.38 gを得た： $mp$  133–135°C。18Aを、19Aのカリウム塩を、アルカリ反応混合物から収率81%(222 mg)で結晶化する以外、実施例1に記載のように対応するヒドロキサム酸に変換した。19Aのカリウム塩(54 mg)を2 mlの沸騰メタノールに溶解し、数滴の水を加え、溶液を0.1 N塩酸で酸性にし、水で希釈して19A 50 mg (収率100%)を得た： $mp$  155–159°C、 $R_f, (D) = 0.49$ 。MS-FAB ( $m/z$ ) 543 ( $M^+ + H$ )。

#### 実施例9

N-[2-イソブチル-3-(N'-ヒドロキシアミドカルボニル)-プロパノイル]-L-トリプトファン(S)-メチルベンジルアミド(21A)の製造

L-トリプトファン(S)-メチルベンジルアミドと3の反応を、実施例1に記載のように行い、酢酸エチルから結晶化の後、N-[2-イソブチル-3-(メトキシカルボニル)-プロパノイル]-L-トリプトファン(S)-メチルベンジルア

ミド 20A 330mg (収率51%)を得た: mp 160-162°C,  $R_f(C) = 0.77$ 。

20Aを、実施例1で使用したのと同様の方法で、収率38%(76mg)でヒドロキサメート 21Aに変換した: mp 165-166°C,  $R_f(D) = 0.73$ 。MS - FAB (m/z) 479 ( $M^+ + H$ )。

### 実施例10

#### N-[L-2-イソブチル-3-(N'-ヒドロキシアミドカルボニル)- プロパノイル]-L-トリプトファン-(6-フェニル-メトキシカルボニル- 1-アミノヘキシル)アミド(27A)の製造

1-アミノ-6-フェニルメトキシカルボニルアミノヘキサン(23)の製造のために、塩化メチレン25ml中の1,6-ジアミノヘキサンおよびベンズアルデヒドの等モル混合物(0.01mol)を、無水硫酸マグネシウム1.5gの存在下室温で5時間攪拌した。乾燥剤を濾過により除去した後、濾液を減圧下蒸発乾燥し、粗1-アミノ-6-フェニルアミノヘキサン 222 g (収率100%)を無色油状物として得た;

NMR (CDCl<sub>3</sub>) 1.1-1.9 (m, 10H, ヘキサンCH<sub>2</sub>-2, -3, -4, -5, NH<sub>2</sub>); 2.6 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-1); 3.51 (m, 2H, ヘキサンCH<sub>2</sub>-6); 7.1-7.8 (m, 5H, 芳香族); 8.16 (s, 1H, イミンCH)。ジクロロメタン20ml中 222 g (0.01mol)およびトリエチルアミン1.4ml (0.01mol)の混合物に、次いでクロロギ酸ベンジル1.78g (0.01mol)を-5°Cで滴下した。得られた混合物を0°Cで0.5時間、室温で2時間攪拌し、次いで塩化メチレンで50mlに希釈し、水(20ml)、2%炭酸水素ナトリウム(20ml)、水および飽和塩化ナトリウムで洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥した。溶媒を減圧下で蒸発させた後、残渣をエタノール5mlに溶解し、2N塩酸を加えた。得られた混合物を6時間室温で攪拌し、次いで減圧下で蒸発乾燥した。残渣を水で50mlまで希釈し、エチルエーテル(2×15ml)で洗浄した。水相を減圧下蒸発させ、生産物 23を少量の水からの結晶化により、収率42%で精製した; mp 175-178°C。

23を誘導体化し、ジペプチド同族体(N-(L-イソブチルー3-メトキシカルボニル)-プロパノイル-L-トリプトファン(25A))を製造した; 塩化メチレン中の50%無水DMF 4ml中の2-イソブチルー3-メトキシカルボニル吉草酸3 1.754 g (9.32 mmol)の混合物に、N,N'-カルボニルジイミダゾール(CDI) 1.66 g (10.2 mmol)を室温で加えた。室温で15分攪拌した後、L-トリプトファンベンジルエステルの塩酸塩 3.08 g (9.31 mmol)を加

えた。得られた混合物を一晩室温で攪拌し、次いで酢酸エチルで60mlまで希釈し、5%炭酸水素ナトリウム(2×15ml)、水(2×15ml)、飽和塩化ナトリウム溶液で洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥した。溶媒の減圧下での蒸発により、25のベンジルエステルである24が、無色泡状物として得られ、それを次工程に更に精製することなく使用した。

メタノール15ml中の24 4.32 g (9.31 mmol)および10%パラジウム-炭素0.5gの混合物に、水素ガスを2時間通して泡立たせ、その間メタノールを反応混合物の用量を一定に保つために加えた。触媒を濾取し、新しいメタノール(15ml)で洗浄し、濾液を減圧下蒸発乾燥させた。減圧下での溶媒の蒸発および真空での残渣の乾燥により、酸25A、B 3.08 g (収率88%)を、2個のジアステレオマーの混合物として、無色ガラス状固体の形で得た。これをフラッシュクロマトグラフィー(シリカゲル; 酢酸エチル;  $R_f(\text{25A}) = 0.24$ 、 $R_f(\text{25B}) = 0.1$ )で25Aおよび25Bの異性体に分離した。

化合物25Aを、下記のようにN-[L-2-イソブチルー3-メトキシカルボニルプロパノイル]-L-トリプトファン(カルボニルアミノヘキシル)アミド(26)に変換した。塩化メチレン中の2%ジメチルホルムアミド1ml中の25A 0.55 g (1.47 mmol)およびCDI 0.24 g (1.48 mmol)の混合物を0.5時間室温で攪拌し、23 0.42 g (1.47 mmol)を加えた。室温で一晩攪拌した後、混合物をクロロホルムで50mlまで希釈し、2%硫酸水素カリウム(2×10ml)、水(10ml)、5%炭酸水素ナトリウム(2×10ml)、水(2×10ml)および飽和塩化ナトリウムで洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥した。溶媒の減圧下での蒸発により、粗26A 0.8gを得、それをフラッシュクロマトグラ

フィー(シリカゲル；酢酸エチル／ヘキサン25：5)で精製した；収率56%；  
 $R_f(E)=0.57$ 。

実施例1の4Aを生産物26Aに変えた場合、同様の方法により、標題化合物  
27A、102-108℃で融解、収率46%を提供した； $R_f(D)=0.63$ 。

#### 実施例11

N-[L-2-イソブチル-3-(N'-ヒドロキシアミドカルボニル)-

プロパノイル]-L-トリプトファンシクロヘキシルアミド(28A)の製造

シクロヘキシルアミンを実施例10の23に変えた場合、同様の方法で標題化  
 合物28A、199-203℃で融解、収率49%を提供した； $R_f(D)=0.5$   
 1。

#### 実施例12

N-[(±)シス-2-(N'-ヒドロキシアミドカルボニル)-シクロヘキシル

カルボニル]-L-トリプロファンメチルアミド(29A、B)の製造

メタノール15ml中のシス-1,2-シクロヘキサンジカルボン酸無水物2  
 g(0.013mol)の混合物を5時間還流し、次いで減圧下蒸発乾燥し、シス-2  
 -メトキシーカルボニルシクロヘキサノーカルボン酸2.41g(収率100%)  
 を得た。実施例1の3をこれに変えた場合、同様の方法で標題化合物、140-  
 144℃で融解、収率36%を提供した； $R_f(D)=0.53$ 、0.47。

#### 実施例13

N-[(±)トランス-2-(N'-ヒドロキシアミドカルボニル)-シクロヘキシル

カルボニル]-L-トリプトファンメチルアミド(30A、B)の製造

(±)トランス-1,2-シクロヘキサンジカルボン酸無水物を実施例12のシ  
 ス-1,2-シクロヘキサンジカルボン酸無水物に変えた場合、同様の方法で標  
 題化合物30A、B、167-174℃で融解、収率37%で提供した； $R_f(D)$   
 $=0.57$ 。

#### 実施例14

N-[2-イソブチル-3-(N'-ヒドロキシアミドカルボニル)-

プロパノイル]-L-トリプトファン(31A)の製造

3 1 Aを、実施例10の2 5 Aから、実施例1の5 Aの製造と同じ方法で、収率75%(128mg)で製造し、酢酸エチルから泡状物として単離した： $R_f(F) = 0.55$ 、 $MS-FAB(m/z)(M+H)$ 。酢酸エチルから再結晶した3 1 Aの少量のサンプルは、 $116-120^{\circ}C$ の融点を有した。

#### 実施例15

N-(D, L-2-イソブチル-3-カルボキシイソプロパノイル)-

#### L-トリプトファン(6-アミノヘキシル-1)アミド(3 2 A)の製造

メタノール中の2N水酸化カリウム0.4ml中の2 6 A0.5gの混合物を一晩室温で攪拌し、次いで減圧下蒸発乾燥した。残渣を水で15mlまで希釈し、1N塩酸で $pH=2$ まで酸性化した。2 6 Aの粗遊離酸を酢酸エチル( $3 \times 15ml$ )で抽出し、有機相を無水硫酸マグネシウムで乾燥し、蒸発乾燥して2 6 A0.45g(収率92%)を無色泡状物として得た。

メタノール15ml中の2 6 Aの遊離酸0.395g(6.6mmol)の混合物に、10%パラジウム-炭素の存在下、室温で、水素ガスを2時間通して泡立たせた。触媒を濾取し、エタノール( $2 \times 20ml$ )で洗浄し、濾液を減圧下蒸発乾燥し、標題化合物3 2 A0.3g(収率92%)を無色泡状物として得た； $R_f(G)=0.08$ 。

#### 実施例16

N-[N-(2-イソブチル-3-カルボキシプロパノイル)-L-トリプトファン]グリシン(3 4 A、B)の製造

L-トリプトファン-グリシンメチルエステルと酸3との反応を2 5 Aについて述べたのと同様に行い、粗N-[N-(D, L-2-イソブチル-3-メトキシーカルボニルプロパノイル)-L-トリプトファン]-グリシンメチルエステル3 3を収率87%で3 3 Aおよび3 3 Bのジアステレオマー混合物として得た。異性体3 3 Aおよび3 3 Bをフラッシュクロマトグラフィー(シリカゲル；酢酸エチル)により分離した。異性体3 3 A $m_p=154-155^{\circ}C$ ； $R_f(C)=0.46$ 。

エステル3 3 A、Bを、2 5 Aについて記載したように、2等量のメタノール

性水酸化カリウムにより鹼化して、遊離酸34A、Bに転換させた、異性体34A収率92%；mp=96-102℃； $R_f(G)=0.31$ 。

異性体34B収率93%；mp=99-105℃； $R_f(G)=0.25$ 。

#### 実施例17

##### N-[(+)-シス-2-カルボキシ-シクロヘキシルカルボニル]-L-トリプトファンメチルアミド(35)の製造

ジメチルホルムアミド0.5ml中のシス-1,2-シクロヘキサンジカルボン酸無水物0.281g(1.82mmol)およびL-Trp-NHMe 0.47gの混合物に、トリエチルアミン0.51mlを室温で加えた。2時間攪拌した後、得られた混合物を水で10mlまで希釈し、酢酸エチル25mlを加えた。得られ混合物を10%硫酸水素カリウムでpH=2まで酸性化し、有機相を水(2×15ml)、飽和塩化ナトリウムで洗浄し、無水硫酸ナトリウムで洗浄し、蒸発乾燥した。標題化合物35を、酢酸エチル-ヘキサン混合物から結晶化して精製した。収率48%；mp=105-112℃； $R_f(G)=0.65$ 、 $0.61$ 。

#### 実施例18

##### N-[(±)トランス-2-カルボキシ-シクロヘキシルカルボニル]-L-トリプトファンメチルアミド(36)の製造

実施例17のシス-1,2-シクロヘキサンジカルボン酸無水物を(±)トランス-1,2-シクロヘキサンジカルボン酸無水物に変えた場合、同様の方法で標題化合物36が56%の収率で提供された：mp=167-174℃； $R_f(G)=0.67$ 、 $0.61$ 。

#### 実施例19

##### N-[2-イソブチル-3-(N'-アセトキシアミドカルボニル)-プロパノイル]-L-トリプトファンメチルアミド(37A)の製造

ジメチルホルムアミド0.5ml中の5A(実施例1)97.5mg(0.25mmol)に、酢酸無水物25.5mg(0.25mmol)および1,8-ジアザビシクロ[5,4,0]ウンデカ-7-エン(DBU)37mg(0.25mmol)を加えた。一晩放置した後、DMFを非常に減圧して蒸発させ、残渣を等量の酢酸エチルおよび2%硫酸水

素カリウムで抽出した。エチル酢酸相を2%硫酸水素カリウム、水および食塩水で洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥し、蒸発させて固体を得た。固体を暖かい酢酸エチル：ヘキサン1：1に溶解し、それを室温で放置して、71mg(収率66%)の固体生産物37Aを得た：mp=184-186℃； $R_f(G)=0.68$ 。

#### 実施例20

N-[2-イソブチル-3-(N'-ベンズオキシアミドカルボニル)-

プロパノイル]-L-トリプトファンメチルアミド(38A)の製造

テトラヒドロフラン1ml中の安息香酸30.5mg(0.25mmol)に、カルボニル-ジイミダゾール40.5mg(0.25mmol)を加えた。10分後、実施例1の化合物5A97mg(0.25mmol)を1mlのジメチルホルムアミド中に加えた。10分後、高減圧下で反応混合物を蒸発乾燥し、等量の酢酸エチルおよび水の混合物中に溶解した。酢酸エチル相を5%炭酸水素ナトリウム、水、2%硫酸水素ナトリウム、水および食塩水で洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥した。酢酸エチル相の少量への蒸発により標題化合物38A50mg(41%)を得た：mp=187-187.5℃； $F_r(G)=0.54$ 。

#### 実施例21

N-(2R-2-カルボキシメチル-4-メチルペンタノイル)-L-  
トリプトファン(S)-メチルベンジルアミド(39A)

N-t Boc-L-トリプトファン(10.04g、32.99mmol)をテトラヒドロフラン(100ml)に溶解し、カルボニルイミダゾール(5.35g、32.99mmol)を加えた。1時間室温で攪拌後、(S)-メチルベンジルアミン(4.25ml、32.99mmol)を添加した。反応物を室温で16時間攪拌し、その後溶媒を除去し、残渣を酢酸エチル(100ml)に溶解した。得られた混合物を0.1N HCl(3×60ml)、飽和水性炭酸水素ナトリウム(2×50ml)および食塩水(20×20ml)で洗浄した。無水硫酸マグネシウムで乾燥した後、溶液を濾過し、乾燥濃縮し、Boc-L-トリプトファン(S)-1-フェニルアミドN-第3級ブチルカルバメート(40、13.78g、収率100%)を得た。

化合物40(2.00g、4.91mmol)をメタノール(40ml)に溶解し、6N水

性塩酸(20ml)を加えた。反応物を室温で2時間攪拌し、乾燥濃縮し、L-トリプトファン(S)-1-フェネチルアミド塩酸塩(41、1.69g、収率95%)を無色固体として得た。

上記のように、カルボニルジイミダゾールの存在下、化合物41を3Aと結合させ(実施例23および24の3Aの合成および構造参照)、N-(2R-2-メトキシカルボニルメチル-4-メチルペンタノイル)-L-トリプトファン(S)

-メチルベンジルアミド(42A)を産生した。

化合物42A(10.04g、21.05mmol)をテトラヒドロフラン(200ml)に溶解し、6N塩酸(200ml)を本溶液に加え、反応物を室温で6時間攪拌し、その後それをクロロホルム(3×200ml)で洗浄した。合わせた有機抽出物を0.1N水酸化ナトリウム(3×150ml)で洗浄した。クロロホルム相を150mlまで濃縮し、再び0.1N水酸化ナトリウム(3×50ml)で洗浄した。合わせた水性抽出物を濃縮塩酸でpH=2まで酸性化し、酢酸エチル(3×50ml)で洗浄した。合わせた酢酸エチル抽出物を無水硫酸マグネシウムで乾燥し、濾過し、濃縮乾燥した。残渣を酢酸エチル(75ml)から再結晶し、N-(2R-カルボキシメチル-4-メチルペンタノイル)-L-トリプトファン(S)-メチルベンジルアミド(39A)を産生した。母液の濾過および濃縮の後、39Aの第2の生産物をジクロロメタン(75ml)からの再結晶して得、合わせた39A(3.72g、38%)の生産物を真空下乾燥した。

化合物42Aが、無水硫酸マグネシウムで乾燥し、濾過し、濃縮したクロロホルム相から回収されたのは注目に値する。残渣をシリカゲル(50%酢酸エチル/ヘキサン)で精製し、42A(2.48g、25%)を回収した。

#### 実施例22

##### N-(2RS-2-メトキシカルボニルメチル-4- メチルペンタノイル)-L-トリプトファン(43)の製造

L-トリプトファン(1.22g、6.0mmol)を水(5.00ml)および6N水性水酸化ナトリウム(0.90ml)に溶解した。得られた溶液を0℃に冷却した。



D, L-イソブチル-3-(メトキシカルボニル)-吉草酸(3、0.94 g、5.0 mmol)をジクロロメタン(3.00 ml)に溶解し、塩化オキザリル(0.44 ml、5.0 mmol)を加えた。得られた溶液を0℃に溶解し、L-トリプトファン溶液に1時間にわたって加えた。この添加の間、反応物を激しく攪拌し、6 N水性水酸化ナトリウムの100  $\mu$ lの定期的な添加によりpHを9以上に維持した。この添加の後、反応物を室温で一晩攪拌し、続いて水および酢酸エチルで希釈した。反応物を10%水性硫酸水素カリウムでpH 2まで酸性化した後、水性相を除き、

酢酸エチル相を2%硫酸水素カリウム(2×10 ml)、水(2×10 ml)および食塩水で洗浄した。有機相を硫酸マグネシウムで洗浄し、濾過し、濃縮した。残渣をシリカゲル(クロロホルム、次いでクロロホルム/メタノール)で精製し、3(0.28 g、29%回収率)および43(1.11 g、収率60%)を得た。

化合物43が、S-メチルベンジルアミンとの結合により42Aへ変換でき、得られた生産物をエタノールから結晶化することにより溶解できることは注目に値する。39Aは化合物42Aから、実施例21に記載のような加水分解により製造できる。

### 実施例 23

#### D, L-2-イソブチル-3-(メトキシカルボニル)-吉草酸(3)の製造

本方法はD, L-2-イソブチル-3-(メトキシカルボニル)-吉草酸(3)の合成の改善法を記載する。無水マレイン酸(750 g、7.65 mol)を暖かいトルエン(500 ml)に溶解し、濾過し、冷して、細かい結晶性沈殿を産生した。得られた混合物を冷蔵庫で更に冷した。2-メチルプロペンを冷トルエン(1 L)に濃縮した。冷無水マレイン酸懸濁液を、更なるトルエン(300 ml)のためにガラス直線パール(Parr) 2ガロン攪拌オートクレーブに移した。2-メチルプロペン溶液、続いて、4-第3級ブチルカテコール(2 g)を次いで加えた。オートクレーブを閉め、攪拌しながら45分170℃で熱し、その温度に更に9.5時間維持した。反応物を、次いで7時間で60℃まで冷し、その後、オートクレーブを排気した。更に1.5時間後、内部温度は45℃に到達し、オートクレーブを開けた。溶媒を除去し、残渣をアスピレーター圧下、部分的に離れた頭で閉めた10

インチ真空被覆ビグレックス(VigruX)カラムを通して蒸留し、未反応無水マレイン酸(139.4 g、収率18.6%)および無水β-メタリルコハク酸(765.3 g、収率79.8%)を得た。

無水β-メタリルコハク酸(539 g、3.50 mol)をトルエン(800 ml)に、加熱被覆で閉めた1700 mlパールステンレスビン中で溶解した。10% Pd/C(3.60 g)を添加し、ビンをも2つの4 L水素タンクで閉じたパール2 Lシェーカーに接続させた。水素の数回の排出および再充填の後、ヒーターを60℃に

調節してシェーカーを始動させた。最初の圧力は60 lbsであった。圧力が101 bsに落ちた場合、タンクを60 lbsに再加圧した。2時間後、調節器を70℃に再調節し、反応を更に12時間続けた。次いで加熱を切り、更に5時間後シェーカーを停止させた。反応容器を排気し、反応混合物を濾過して濃縮した。上記のようなビグレックスカラムを通した残渣の蒸留(P=9-10 mmHg、T=180℃)により、無水イソブチルコハク酸(532.9 g、収率97.6%)を得た。

無水イソブチルコハク酸(501 g、3.21 mole)を無水メタノール(500 ml)に溶解し、室温で5日間放置した。メタノールを除去し、残渣を石油エーテル(500 ml)と混合し、一晩冷却した。固体を濾過し、濾液を冷凍庫に入れた。長期間の保存の後、固体を濾過し、合わせた固体を再び石油エーテルから再結晶し、化合物3(337.5 g、収率55.9%)を得た。

上記の合わせた石油エーテル濾液を濃縮した後、粗物質[主に(R,S)3-メトキシカルボニル-5-メチル吉草酸からなる]188 g(1 mole)を水酸化ナトリウム(120 g、3 mole)および水(700 ml)と混合した。混合物を14時間蒸気浴上で攪拌した。混合物を濾過し、濃縮硫酸(90 ml)で酸性化し、冷却した。硫酸ナトリウムおよび二酸(diacid)の懸濁液を濾過し、固体を酢酸エチル(500 ml)で完全に洗浄した。水性溶液を酢酸エチルで洗浄し、合わせた酢酸エチル相を濃縮し真空下で濃縮し、乾燥して二酸(162.8 g、収率93.6%)を得た。二酸を無水酢酸(150 ml)と共に10インチ真空被覆ビグレックスカラムで熱した。酢酸を数時間にわたって118-120℃で除去した。温度が下がり始めた場合、圧力を徐々に減少させ、過剰の無水酢酸を除去した。無水イソブチルコハク

酸(138 g、収率88.5%)を蒸留(P=10 mmHg、T=144℃)により回収し、本発明製造の最終工程に再循環させた。

#### 実施例 2 4

##### (3)の(3A)への分割

D, L-2-イソブチル-3-(メトキシカルボニル)-プロピオン酸(3、17.55 g、93.35 mmole)をジエチルエーテル(85 ml)に溶解し、S-メチルベンジルアミン(13.24 ml、102.69 mmole)を添加した。反応液を室温で24時間、攪拌し、固体を濾取した。エタノール/ジエチルエーテルからの固体の再結晶により、単一ジアステレオマーとして塩44A(9.24 g、32%質量回収、収率64%)を得た。

44A(1.29 g、4.18 mmole)を飽和重炭酸ナトリウム水溶液に溶解し、酢酸エチルで3回洗浄した。混合した酢酸エチル層を飽和重炭酸ナトリウム水溶液で洗浄し、混合した水性層を6N塩酸水で酸性とし、酢酸エチルで3回洗浄した。混合した酢酸エチル層を飽和塩化ナトリウム水溶液で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥し、濾過し、濃縮して3Aを得た(0.77 g、収率98%、 $[\alpha]_D^{25} = +19.8 \text{ deg.}$ )。

#### 実施例 2 5

N-[2R-イソブチル-3-(N'-ヒドロキシアミドカルボニル)-プロパノイル]-トリプトファン-3(4-モルホリニル)-n-プロピルアミド(50)の製造

ジクロロメタン(20 ml)中t-BOC-トリプトファン(6 g)の懸濁液をカルボニルジイミダゾール(3.26 g)と混合し、室温で20分間攪拌した。この混合物に4-モルホリニル-n-プロピルアミン(2.88 ml)を加えて、これを室温で一晩攪拌し、水(100 ml)で反応を停止し、酢酸エチル(300 ml)で抽出した。有機層を食塩水で洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥し、濾過し、濃縮して粗製モルホリンアミド(45)を得た。

化合物45をシクロロメタン(30 ml)、トリフルオロ酢酸(30 ml)およびアニソール(6 ml)を含む溶媒混合物に溶解し、室温で2時間攪拌した。溶液を

ヘキサン (60 ml) と、次いで、ジエチルエーテル (120 ml) と混合し、上清をデカントし、残査を蒸発乾固してトリフロロ酢酸塩 (46) を得た。

4-(*t*-ブトキシ)-2*R*-イソブチルコハク酸 (0.46 g) (ヨーロッパ特許出願第92301051.8号、1992年7月2日出願参照) およびカルボニルジイミダゾール (0.32 g) のジクロロメタン (3 ml) 溶液を室温で20分間攪拌し、46 (1.18 g) とジイソプロピルエチルアミン (0.74 ml) のジメチルホルムアミド (3 ml) 溶液に加えた。本混合物を室温で一晩攪拌し、酢酸エチルで抽出し (2×50 ml)、重炭酸ナトリウム (30 ml) で洗浄した。粗製物をシリカゲルカラムで精製 (ジクロロメタン:メタノール、95:5) して*t*-ブチルエステル (47、1.0 g) を得た。

化合物47をジクロロメタン (3 ml)、トリフロロ酢酸 (3 ml) およびアニソール (1.2 ml) に溶解し、室温で2時間攪拌し、蒸発乾固した。残査 (0.2 g) を重炭酸ナトリウム (0.1 g) と混合し、水 (2 ml) に溶解し、水中20%アセトニトリルまでの水の勾配によるC18カラムで精製してナトリウム塩 (48) を得た。

48 (0.1 g) の遊離酸のテトラヒドロフラン (1 ml) 溶液を-12℃で*N*-エチルモルホリン (0.05 ml) およびクロロギ酸イソブチル (0.046 ml) と混合し、30分間攪拌した。これを*O*-ベンジルヒドロキシアミン塩酸塩 (0.028 g) と*N*-エチルモルホリン (0.05 ml) のジメチルホルムアミド (1 ml) 溶液に加え、温度を-12℃から室温まで徐々に上げながら一晩攪拌した。反応混合物を水 (20 ml) で失活し、酢酸エチル (50 ml) で抽出し、重炭酸ナトリウム溶液 (20 ml) で洗浄し、乾燥し、蒸発させた。粗製混合物をシリカゲルカラムで精製し (ジクロロメタン:メタノール、9:1)、*O*-ベンジルヒドロキサミド (49、0.06 g) を得た。

化合物49 (1 g) をメタノール (20 ml) に溶解し、炭素上5%パラジウム (50 mg) を加えて反応混合物を水素雰囲気 (バルーン圧) 下、6時間攪拌した。混合物をメタノール (20 ml) で希釈し、セライト濾過し、濃縮した。残査をメタノールと酢酸エチルから結晶させて化合物50 (640 mg) を得た。

### 実施例 26

N-[2-イソブチル-3-(N'-ヒドロキシアミドカルボニル)-プロパノイル]-L-トリプトファン-3-(4-モルホリニル)-n-エチルアミン (52) の製造

4-モルホリニルエチルアミンを実施例25の4-モルホリニル-n-プロピルアミンと置き換えると、同一方法によりナトリウム塩(51)と化合物52が得られた。

### 実施例 27

N-[2-イソブチル-3-ヒドロキシカルボニルプロパノイル]-L-トリプトファン-(4-ピリジル)メチルアミド (53) の製造

N-t-Boc-L-トリプトファン (5.07g、16.66mmole) をテトラヒドロフラン (20ml) に溶解し、カルボニルジイミダゾール (2.70g、16.66mmole) を溶液に加えた。反応液を室温で1時間攪拌し、4-アミノメチルピリジン (1.69ml、16.66mmole) を加えて反応液を室温で3時間攪拌した。溶媒を除去して残査を水で徹底的に洗浄し、真空下に乾燥してN-t-Boc-L-トリプトファン-(4-ピリジル)-メチルアミド54 (6.38g、収率97%) を得た。

化合物54 (6.38g、16.19mmole) を2N HClに溶解し、室温で24時間攪拌し、濃縮、乾燥してL-トリプトファン-(4-ピリジル)-メチルアミド55 (5.90g、収率99%) を得た。

4-(t-ブトキシ)-2R-イソブチルコハク酸 (1.19g、5.16mmole) のテトラヒドロフラン (20ml) 溶液をカルボニルジイミダゾール (0.84g、5.16mmole) と混合し、反応液を室温で1時間攪拌し、55 (1.89g、5.16mmole) を、次いでトリエチルアミン (1.44ml、10.32mmole) を加えた。反応液を室温で18時間攪拌し、酢酸エチル (50ml) で希釈し、飽和重炭酸ナトリウム水溶液で (3×10ml) そして食塩水 (10ml) で洗浄した。有機相を無水硫酸マグネシウムで乾燥し、濾過し、濃縮して、残査を酢酸エチル/ヘキサンから再結晶してt-ブチルエステル56 (1.15g、収率44%) を得た。

化合物56 (0.12g、0.24mmole) をジクロロメタン (1ml) に溶解し、トリフロロ酢酸 (1ml) を加えて反応液を室温で2.5時間攪拌し、次いで濃縮して乾燥した。残渣を飽和重炭酸ナトリウム水溶液 (5ml) と混合し、酢酸エチル (3ml) で抽出した。酢酸エチル液を無水硫酸マグネシウムで乾燥し、濾過し、濃縮して、残渣を酢酸エチル (1ml) から再結晶して化合物53 (22.6mg、収率21%) を得た。

#### 実施例28

N-[2-イソブチル-3-ヒドロキシカルボニルプロパノイル]-L-トリプトファン-ベンジルアミド (57) の製造

ベンジルアミンを実施例25の4-モルホリニル-n-プロピルアミンと置き換えると、同一方法により化合物57を得た。

#### 実施例29

N-[2-イソブチル-3-ヒドロキシカルボニルプロパノイル]-L-トリプトファン-2-(フェニル)エチルアミド (58) の製造

2-フェニルエチルアミンを実施例25の4-モルホリニル-n-プロピルアミンと置き換えると、同一方法により化合物58を得た。

#### 実施例30

N-[2-イソブチル-3-ヒドロキシカルボニルプロパノイル]-L-トリプトファン-2-(4-ベンゼンスルホンアミド)エチルアミド (60) の製造

4-(2-アミノエチル)ベンゼンスルホンアミドを実施例25の4-モルホリニル-n-プロピルアミンと置き換えると、同一方法により対応するカルボン酸59と化合物60を得た。

#### 実施例31

N-[D, L-3-イソブチル-3-(ヒドロキシカルボニル)-プロパノイル]-L-トリプトファンメチルアミド (61) の製造

N-[D, L-2-イソブチル-3-(ヒドロキシカルボニル)-プロパノイル]-L-トリプトファンメチルアミド (4、10g) をテトラヒドロフランに溶解した。溶液を氷浴中で冷却し、6N HCl (200ml) を加えた。得られる混合

物を20-25℃で16-18時間攪拌した。反応混合物を氷浴中で冷却し、6 N HClをpHが2になるまで添加した。有機層を分離し、水性層を酢酸エチル

(200ml)で抽出した。有機層を混合し、乾燥し、濾過し、濃縮・乾固して化合物61(10.5g)を得た。粗生成物をメタノール：酢酸エチル勾配を2%、5%および10%で用いるフラッシュクロマトグラフィーにより精製して精製61(6.8g)を得た。

### 実施例32

N-[D, L-2-イソブチル-3-(ヒドロキシカルボニル)-プロパノイル]-L-トリプトファンメチルアミド(62)の製造

N-[D, L-2-イソブチル-3-(ヒドロキシカルボニル)-プロパノイル]-L-トリプトファンメチルアミド(4, 20g)をメタノール(300ml)に溶解し、水酸化リチウム(4.33g)と水(100ml)を室温で溶液に加えた。反応混合物を20-25℃で12-16時間攪拌し、1 N HCl(100ml、pH 2)で中和した。過剰のメタノールを真空で除去し、水性層を酢酸エチルで抽出した(2×300ml)。混合した有機層を硫酸マグネシウムで乾燥し、濾過し、濃縮・乾固して標題化合物62(25.7g)を得た。粗生成物をアセトニトリル(200ml)から再結晶して精製62(6.5g)を得た。

### 実施例33

N-[D, L-2-イソブチル-3-(N'-ヒドロキシアミドカルボニル)-プロパノイル]-トリプトファンメチルアミド(5A、5B)の製造

N-(2RS-2-メトキシカルボニルメチル-4-メチルペンタノイル)-L-トリプトファン(42)を実施例22に記載される通りに製造した。化合物42を、テトラヒドロフラン中、メチルアミンと、室温で一晩、カルボニルジイミダゾールを用い結合させて4Aと4Bの混合物を得た。

4Aと4Bの混合物を、実施例1に記載した通りにそのヒドロキサム酸に直接変換した。化合物5Aを5Aと5Bの混合物から結晶化した。

5Bを含有する母液のpH 5の中和による塩基加水分解、続く部分蒸発により結晶L-トリプトファンを得、これは43の合成に使用するためにリサイクルす

る。

### 実施例 3 4

N-[R-2-イソブチル-3-(N'-ヒドロキシカルボニルアミド)-4-フェニル-ブタノイル]-L-トリプトファン-メチルアミド (65) の製造

4-(t-ブトキシ)-2R-イソブチルコハク酸 (2.3mg、10mmole) のテトラヒドロフラン溶液をテトラヒドロフラン (25mmole) 中、リチウムジイソプロピルアミドの溶液に-45℃で添加した。混合物を0℃まで徐々に暖めて3時間攪拌した。臭化ベンジル (1.5ml) を加えて、混合物を室温で一晩攪拌した。混合物を蒸発させ、残渣を希重炭酸ナトリウム溶液と酢酸エチルとの間に分配した。水性層を1N塩酸で酸性とし、酢酸エチルで抽出した (2×100ml)。混合した有機層を水 (50ml)、食塩水で洗浄し、乾燥し、濃縮してベンジル誘導体63 (2.3g) を得た。

ジメチルホルムアミド (6ml) 中63の溶液をカルボニルジイミダゾール (1.24g) と混合し、室温で30分間攪拌した。L-トリプトファン-メチルアミド塩酸塩 (2.2g) を加え、混合物を室温で一晩攪拌した。混合物を酢酸エチル (200ml) で希釈し、水 (50ml) で、次いで重炭酸ナトリウム溶液および食塩水で洗浄し、乾燥し、濃縮した。粗製物をシリカゲルカラム (95:5 ジクロロメタン:メタノール) で精製してt-ブチルエステル64 (1.8g、35%) を得た。

t-ブチルエステル64を実施例25に記載される方法に従って化合物65に変換した。

### 実施例 3 5

N-[R-2-イソブチル-3-ヒドロキシカルボニルプロパノイル]-L-トリプトファン-3-(N'N'-ジメチル)-n-プロピルアミド (66) の製造

3-N'N'-ジメチルアミノプロピルアミンを実施例25の4-モルホリニル-n-プロピルアミンと置き換えると、同一方法により化合物66を得た。

### 実施例 3 6

N-[R-2-イソブチル-3-(N'-ベンジルオキシアミドカルボニル)-ブ



ロパノイル]ートリプトファンメチルアミン (67) の製造

5 A (4.9 g、12.62 mmole)、臭化ベンジル (1.8 ml、12.62 mmole)

および炭酸カリウム (2.6 g、18.88 mmole) のジメチルホルムアミド (20 ml) 懸濁液を室温で一晩攪拌した。混合物を酢酸エチル (300 ml) にあけ、有機層を水 (2×50 ml)、食塩水で洗浄し、乾燥し、濃縮した。粗製物を酢酸エチルから結晶させて化合物 67 (3.7 g、61%) を得た。

### 実施例 37

N-[R-2-イソブチル-3-(N'-ベンジル-N'-ヒドロキシーアミドカルボニル)ープロパノイル]ーL-トリプトファンメチルアミド (69) の製造

5 A (800 mg、2.06 mmole)、臭化ベンジル (0.7 ml) および炭酸カリウム (1.1 g) のジメチルホルムアミド (5 ml) 懸濁液を室温で一晩攪拌した。混合物を酢酸エチル (100 ml) にあけ、有機層を水 (2×50 ml)、食塩水で洗浄し、乾燥し、濃縮した。粗製物をシリカゲルカラム (2:1 酢酸エチル:ヘキサン) で精製して化合物 68 (363 mg、32%)、67 のO-ビスベンジル誘導体を得た。

化合物 68 (50 mg) および炭素上5%パラジウム (5 mg) のメタノール (5 ml) 溶液を水素雰囲気 (バルーン圧) 下、10時間攪拌した。混合物はセライト濾過し、次いでシリカゲル (95:5クロロホルム:メタノール) での精製により、化合物 69 (38 mg) を得た。

### 実施例 38

N-[R-2-イソブチル-3-(N'-フルオロフェニルメチル-N'-ヒドロキシアミノカルボニル)ープロパノイル]ーL-トリプトファンメチルアミド (71) の製造

67 (200 mg、0.42 mmole)、p-フルオロベンジルブロミド (64 μl、0.51 mmole) および炭酸カリウム (87 mg) のジメチルホルムアミド (1 ml) 懸濁液を室温で一晩攪拌した。混合物を酢酸エチル (30 ml) にあけ、有機層を水 (2×10 ml)、食塩水で洗浄し、濃縮した。粗製物をシリカゲルカラム (

95 : 5 クロロホルム : メタノール) で精製してベンジル誘導体 (100mg、41%) を得た。

化合物70 (100mg) と炭素上5%パラジウム (10mg) のメタノール (5ml) 溶液を水素雰囲気 (バルーン圧) 下に一晚攪拌した。混合物はセライトを濾過し、次いでシリカゲルカラム (95 : 5 クロロホルム : メタノール) による精製により化合物71 (50mg) を得た。

### 実施例39

N-[R-2-イソブチル-3-(N'-メトキシメチル-N'-ヒドロキシアミドカルボニル)-プロパノイル]-L-トリプトファンメチルアミド (73) の製造

67 (1g、2.1mmole)、ピバル酸ヨードメチル (760mg、3mmole) および炭酸カリウム (430mg) のジメチルホルムアミド (5ml) 懸濁液を室温で一晩攪拌した。さらにピバル酸ヨードメチル (760mg) と炭酸カリウム (430mg) を加えて、混合物を室温で一晩攪拌した。混合物を酢酸エチル (200ml) にあけ、有機層を水 (2×50ml)、食塩水で洗浄し、(Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 乾燥し、濃縮した。粗製物をシリカゲルカラム (95 : 5 クロロホルム : メタノール) で精製してエステル72 (300mg、24%) を得た。

化合物72 (300mg) と炭素上5%パラジウム (100mg) のメタノール (10ml) 溶液を水素雰囲気 (バルーン圧) 下、一晚攪拌した。混合物をセライト濾過し、次いでシリカゲルカラム (95 : 5 クロロホルム : メタノール) による精製で化合物73 (60mg) を得た。

### 実施例40

N-[R-2-イソブチル-3-(N'-ピバリルメチル-N'-ヒドロキシアミドカルボニル)-プロパノイル]-L-トリプトファンメチルアミド (74) の製造

化合物72 (300mg) と炭素上5%パラジウム (100mg) の酢酸エチル (10ml) 溶液を水素雰囲気下に一晚攪拌した。混合物をセライト濾過し、次いでシリカゲルカラム (95 : 5 クロロホルム : メタノール) による精製で化合物7

4 (100mg) を得た。

#### 実施例 4 1

N-[R-2-イソブチル-3-(N'-カルボキシルメチル-N'-ヒドロキシ-アミドカルボニル)-プロパノイル]-L-トリプトファンメチルアミド (76) の製造

67 (180mg) と炭酸カリウム (100mg) のジメチルホルムアミド (3ml) 懸濁液を室温で30分間攪拌した。プロモ酢酸ベンジルエステル (72ml) を加えて、混合物を4時間攪拌した。混合物を酢酸エチル (10ml) にあけ、有機層を水 (2×20ml)、食塩水で洗浄し、乾燥し、濃縮した。粗製物をシリカゲルカラム (ジクロロメタン中1%メタノール) で精製してエステル75 (50mg) を得た。

化合物75 (50mg) と炭素上5%パラジウム (5mg) のメタノール (2ml) 溶液を水素雰囲気下で2時間攪拌した。混合物をセライト濾過し、次いでシリカゲルカラム (95:5 クロロホルム:メタノール) による精製で化合物76 (18ml) を得た。

#### 実施例 4 2

Boc-D-ガンマーヒドロキシアミドグルタミル-L-トリプトファン-(S)-メチルベンジルアミド (79) の製造

Boc-D-グルタミン酸ガンマベンジルエステルを、ジクロロメタンとジメチルホルムアミドの混合物中、カルボニルジイミダゾールを用い、L-トリプトファン-(S)-メチルベンジルアミドと結合させた。反応混合物を酢酸エチルおよび水で希釈し、有機層を重炭酸ナトリウム、硫化水素カリウム、水および食塩水で洗浄した。酢酸エチル層の蒸発により完全に保護された中間体77を得た。

メタノール中、木炭上パラジウムを用いる水素化分解による中間体77の脱保護、続く触媒の濾過および蒸発によって、カルボン酸78を得た。

メタノール中、ヒドロキシルアミン塩化水素のカリウム塩を用いる酸78のヒドロキサミノリシスにより化合物79を得た。

#### 実施例 4 3

Boc-D-β-ヒドロキサミドアスパルチル-1-トリプトファン-(S)-メチルベンジルアミド(82)の製造

Boc-D-アスパラギン酸ガンマベンジルエステルを、ジクロロメタンとジメチルホルムアミドの混合物中カルボニルジイミダゾールを用い、L-トリプトファン-(S)-メチルベンジルアミドと結合させた。反応混合物を酢酸エチルおよび水で希釈し、有機相を重炭酸ナトリウム、硫化水素カリウム、水および食塩水で洗浄した。酢酸エチル層の蒸発により完全に保護された中間体80を得た。

メタノール中、木炭上パラジウムを用いる水素化分解による中間体80の脱保護、続く触媒の濾過および蒸発によって、カルボン酸81を得た。

メタノール中、ヒドロキシルアミン塩化水素のカリウム塩を用いる酸81のヒドロキサミノリシスにより化合物82を得た。

#### 実施例44

N-[D, L-2-イソブチル-3-(N'-ヒドロキシアミドカルボニル)-プロパノイル]-トリプトファンメチルアミドの製造

L-トリプトファンをホスゲンと反応させてN-カルボキシ無水物誘導体83を得る。化合物83をメチルアミン(1当量)と反応させ、次いで塩酸で処理して塩84を得る。

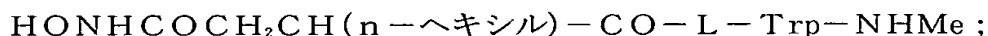
テトラヒドロフラン中、イソブチルコハク酸無水物を、塩基の存在下、室温で84で処理してカンボン酸85と86の混合物を得る。これらを緩やかな条件下、メタノールでエステル化して各エステル4および87を得る。

4と87の混合物を上記実施例1に記載されるようにそのヒドロキサメートに直接変換する。化合物5Aを5Aおよび5Bの混合物から結晶化する。

別法として、酸85および86は酢酸無水物または他のカップリング剤と反応させてコハク酸誘導体89を得てもよく、これはさらにヒドロキサミノリシスにより高収率で5Aを与える。

#### 実施例45

上記した方法を適用して、以下の発明化合物が合成される。



$\text{HONHCOCH}_2\text{CH}(\text{n-ペンチル})-\text{CO}-\text{L}-\text{Trp}-\text{NHMe};$   
 $\text{HONHCOCH}_2\text{CH}(\text{i-ペンチル})-\text{CO}-\text{L}-\text{Trp}-\text{NHMe};$   
 $\text{HONHCOCH}_2\text{CH}(\text{エチル})-\text{CO}-\text{L}-\text{Trp}-\text{NHMe};$   
  
 $\text{HONHCOCH}_2\text{CH}(\text{エチル})-\text{CO}-\text{L}-\text{Trp}-\text{NHCH}_2\text{CH}_3;$   
 $\text{HONHCOCH}_2\text{CH}(\text{エチル})-\text{CO}-\text{L}-\text{Trp}-\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{OH};$   
 $\text{HONHCOCH}_2\text{CH}(\text{エチル})-\text{CO}-\text{L}-\text{Trp}-\text{NHシクロヘキシル};$   
 $\text{MeONHCOCH}_2\text{CH}(\text{iBu})-\text{CO}-\text{L}-\text{Trp}-\text{NHEt};$   
 $\text{EtONMeCOCH}_2\text{CH}(\text{iBu})-\text{CO}-\text{L}-\text{Trp}-\text{NHEt};$   
 $\text{MeONHCOCH}_2\text{CH}(\text{iBu})-\text{CO}-\text{L}-\text{Ala}(\text{2-ナフチル})-\text{NHEt};$   
 $\text{EtONMeCOCH}_2\text{CH}(\text{iBu})-\text{CO}-\text{L}-\text{Ala}(\text{2-ナフチル})-\text{NHEt};$   
 $\text{EtONHCONMe}-\text{CH}_2\text{CH}(\text{iBu})-\text{CO}-\text{L}-\text{Trp}-\text{NHEt};$   
 $\text{EtCONOH}-\text{CH}_2\text{CH}(\text{iBu})-\text{CO}-\text{L}-\text{Trp}-\text{NHEt};$   
 $\text{n-PrCONOEt}-\text{CH}_2\text{CH}(\text{iBu})-\text{CO}-\text{L}-\text{Trp}-\text{NHEt};$   
 $\text{EtNHCONOMe}-\text{CH}_2\text{CH}(\text{iBu})-\text{CO}-\text{L}-\text{Trp}-\text{NHEt};$   
 $\text{MeNHCONOH}-\text{CH}_2\text{CH}(\text{iBu})-\text{CO}-\text{L}-\text{Trp}-\text{NHEt};$   
 $\text{EtONHCONMe}-\text{CH}_2\text{CH}(\text{iBu})-\text{CO}-\text{L}-\text{Ala}(\text{2-ナフチル})-\text{NHEt};$   
 $\text{EtCONOH}-\text{CH}_2\text{CH}(\text{iBu})-\text{CO}-\text{L}-\text{Ala}(\text{2-ナフチル})-\text{NHEt};$   
 $\text{n-PrCONOEt}-\text{CH}_2\text{CH}(\text{iBu})-\text{CO}-\text{L}-\text{Ala}(\text{2-ナフチル})-\text{NHEt};$   
 $\text{EtNHCONOMe}-\text{CH}_2\text{CH}(\text{iBu})-\text{CO}-\text{L}-\text{Ala}(\text{2-ナフチル})-\text{NHEt};$   
 $\text{MeNHCONOH}-\text{CH}_2\text{CH}(\text{iBu})-\text{CO}-\text{L}-\text{Ala}(\text{2-ナフチル})-\text{NHEt};$   
 $\text{HONHCONHCH}_2\text{CH}(\text{iBu})-\text{CO}-\text{L}-\text{TrpNHMe};$   
 $\text{HONHCONHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{iBu})-\text{CO}-\text{L}-\text{TrpNHMe};$   
 $\text{HONHCONHCH}(\text{iBu})\text{CO}-\text{L}-\text{TrpNHMe};$   
 $\text{H}_2\text{NCON}(\text{OH})\text{CH}(\text{iBu})\text{CO}-\text{L}-\text{TrpNHMe};$   
 $\text{N}(\text{OH})\text{CH}_2\text{CH}(\text{iBu})\text{CO}-\text{L}-\text{TrpNHMe};$   
 $\text{H}_2\text{NCON}(\text{OH})\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{iBu})\text{CO}-\text{L}-\text{TrpNHMe};$   
 $\text{CH}_3\text{CON}(\text{OH})\text{CH}(\text{iBu})\text{CO}-\text{L}-\text{TrpNHMe};$   
 $\text{CH}_3\text{CON}(\text{OH})\text{CH}_2\text{CH}(\text{iBu})\text{CO}-\text{L}-\text{TrpNHMe};$

$\text{CH}_3\text{CON}(\text{OH})\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{i-Bu})\text{CO-L-TrpNHMe}$  ;  
 $\text{HNOHCOCH}_2\text{CH}(\text{i-Bu})\text{CO-L-TrpNHMe}$  ;  
 $\text{HONHCOCH}_2\text{CH}(\text{i-Bu})\text{CO-L-TrpNH}(\text{CH}_2)_3-(4\text{-メルホリニル})$  ;  
  
 $\text{HONHCOCH}_2\text{CH}(\text{i-Bu})\text{CO-L-TrpNH}(\text{CH}_2)_2-(4\text{-メルホリニル})$  ;  
 $\text{HOOCCH}_2\text{CH}(\text{i-Bu})\text{CO-L-TrpNHCH}_2\text{Ph}$  ;  
 $\text{HOOCCH}_2\text{CH}(\text{i-Bu})\text{CO-L-TrpNHCH}_2\text{CH}(-4\text{-ピリジル})$  ;  
 $\text{HOOCCH}_2\text{CH}(\text{i-Bu})\text{CO-L-TrpNH}(\text{CH}_2)_2\text{Ph}$  ;  
 $\text{HOOCCH}_2\text{CH}(\text{i-Bu})\text{CO-L-TrpNH}(\text{CH}_2)_2-(4\text{-ベンゼンスルホニルアミド})$  ;  
  
 $\text{HOOCCH}(\text{i-Bu})\text{CH}_2\text{CO-L-TrpNHMe}$  ;  
 $\text{HOOCCH}_2\text{CH}(\text{i-Bu})\text{CO-L-TrpNHMe}$  ;  
 $\text{HONHCOCH}(\text{i-Bu})\text{CH}_2\text{CO-L-TrpNHMe}$  ;  
 $\text{BnONHCOCH}_2\text{CH}(\text{i-Bu})\text{CO-L-TrpNHMe}$  ;  
 $\text{HON}(\text{Bn})\text{COCH}_2\text{CH}(\text{i-Bu})\text{CO-L-TrpNHMe}$  ;  
 $\text{HON}(\text{p-フルオロ-Bn})\text{COCH}_2\text{CH}(\text{i-Bu})\text{CO-L-TrpNHMe}$  ;  
 $\text{BnON}(\text{CH}_2\text{OCH}_3)\text{COCH}_2\text{CH}(\text{i-Bu})\text{CO-L-TrpNHMe}$  ;  
 $\text{HON}(\text{CH}_2\text{OPiv})\text{COCH}_2\text{CH}(\text{i-Bu})\text{CO-L-TrpNHMe}$  ;  
 $\text{HON}(\text{CH}_2\text{COOH})\text{COCH}_2\text{CH}(\text{i-Bu})\text{CO-L-TrpNHMe}$  ;  
 $\text{HONHCOCH}(\text{Bn})\text{CH}(\text{i-Bu})\text{CO-L-TrpNHMe}$  ;  
 $\text{HOOCCH}_2\text{CH}(\text{i-Bu})\text{CO-L-TrpNH}(\text{CH}_2)_3\text{NCH}_3$  ;  
 $\text{HOOC}(\text{CH}_2)_2\text{CH}(\text{NHCOO-t-Bu})\text{CO-L-TrpNCH}(\text{CH}_3)\text{Ph}$  ;  
 $\text{HONHOC}(\text{CH}_2)_2\text{CH}(\text{NHCOO-t-Bu})\text{CO-L-TrpNCH}(\text{CH}_3)\text{Ph}$  ;  
 $\text{HOOCCH}_2\text{CH}(\text{NHCOO-t-Bu})\text{CO-L-TrpNCH}(\text{CH}_3)\text{Ph}$  ; 及び  
 $\text{HONHOCCH}_2\text{CH}(\text{NHCOO-t-Bu})\text{CO-L-TrpNCH}(\text{CH}_3)\text{Ph}$ 。

製造された幾つかの化合物の阻害活性の測定は上記したように実施され、表1および表2に示す結果を与える。

表 1

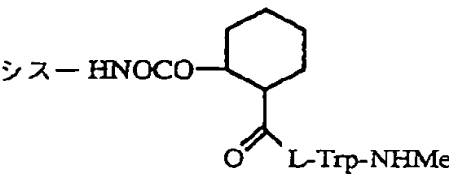
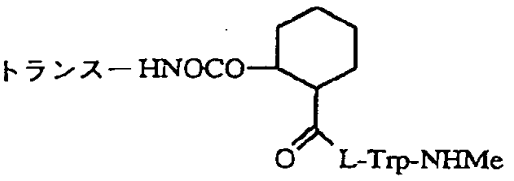
番号	化合物	K <sub>i</sub> (nM)
1 5A	NHOHCOCH <sub>2</sub> CH(i-Bu)CO-L-Trp-NHMe	10
5B	NHOHCOCH <sub>2</sub> CH(i-Bu)CO-L-Trp-NHMe	150
2 7A	NHOHCOCH <sub>2</sub> CH(i-Bu)CO-D-Trp-NHMe	70,000
3 9A	NHOHCOCH <sub>2</sub> CH(i-Bu)CO-L-N-MeTrp-NHMe	500
4 11A	NHOHCOCH <sub>2</sub> CH(i-Bu)CO-L-Ala(2- <i>i</i> -ナフチル)NHMe	15
5 13A	NHOHCOCH <sub>2</sub> CH(i-Bu)CO-L-Trp-NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> OH	20
6 15A	NHOHCOCH <sub>2</sub> CH(i-Bu)CO-L-Trp-NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> CH <sub>3</sub>	30
7 17A,B	NHOHCOCH <sub>2</sub> CH(i-Bu)CO-L-Trp-ヒペリジン	200
8 19A	NHOHCOCH <sub>2</sub> CH(i-Bu)CO-L-Trp-NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>11</sub> CH <sub>3</sub>	300
9 21A	NHOHCOCH <sub>2</sub> CH(i-Bu)CO-L-Trp-NH(S)CHMePh	3
10 27A	NHOHCOCH <sub>2</sub> CH(i-Bu)CO-L-Trp-NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> NH-CBZ	13
11 28A	NHOHCOCH <sub>2</sub> CH(i-Bu)CO-L-Trp-NHシクロヘキシル	50
12 29A,B		>10,000
 <p>シス-HNOCO- O L-Trp-NHMe 13 30A,B</p>		
		>10,000
 <p>トランス-HNOCO- O L-Trp-NHMe 14 31A</p>		
		NHOH
	CO-CH <sub>2</sub> CH(i-Bu)-L-Trp-OH	200
15 32A	HOOC-CH <sub>2</sub> CH(i-Bu)CO-L-Trp-NH(CH <sub>2</sub> )NH <sub>2</sub>	>10,000

表 1 (続)

番号	化合物	K <sub>i</sub> (nM)
16 34A	HOCO-CH <sub>2</sub> CH(i-Bu)CO-L-Trp-Gly-OH	>10,000
34B	HOCO-CH <sub>2</sub> CH(i-Bu)CO-L-Trp-Gly-OH	>10,000
17 35		>10,000

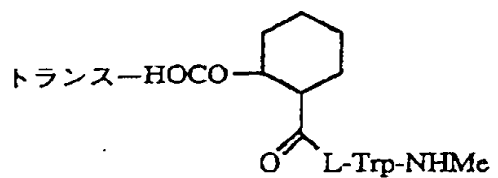
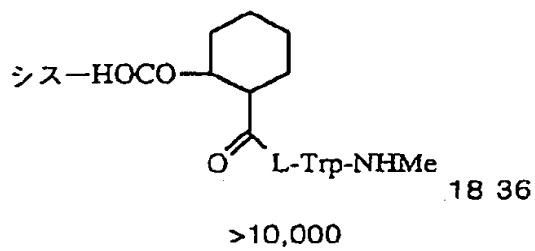




表 2

<u>化合物番号</u>	<u>72kD G<sup>a</sup></u>	<u>92kD G<sup>b</sup></u>	<u>Strom<sup>c</sup></u>	<u>NC<sup>d</sup></u>	<u>HGFC<sup>e</sup></u>
5A	0.26	0.22	27	0.12	-
5B	298	-	>1000	54	23
9A	32	-	>1000	29	5
11A	-	-	-	-	0.3
13A	-	-	-	-	1
15A	-	-	-	-	0.3
17	-	-	-	-	-
19A	0.37	1.29	40	0.62	0.001
20A	-	-	-	-	0.2
21A	-	-	-	-	0.001
27A	2.9	-	94	21	0.1
28A	4.0	-	78	1.0	0.1
29	-	-	-	-	-
30	-	-	-	-	-
31A	-	-	-	-	-
32A	-	-	-	-	-
34A	-	-	-	-	-
34B	-	-	-	-	-
35	-	-	-	-	-
36	-	-	-	-	-
48	145	65	19331	32	-
50	-	-	-	-	-
51	-	-	-	-	32
52	0.81	0.97	57	0.19	0.6
53	-	-	-	-	-

表 2 (続)

<u>化合物番号</u>	<u>72kD G</u>	<u>92kD G</u>	<u>Strom</u>	<u>NC</u>	<u>HGEC</u>
57	57	37	5145	20	2.2
58	79	-	10587	26	-
59	265	-	38178	85	-
60/61	-	-	-	-	3
78	>10000	>10000	>10000	>10000	2000
79	>10000	21098	>10000	>10000	60
81	>10000	>10000	>10000	>10000	500
82	9262	3585	>10000	3265	80

上記のすべての測定値単位はnmolである。

a = 正常ヒト72kDゲラチナーゼ

b = 92kDゲラチナーゼ

c = ストロメリシン

d = 組換え好中球コラゲナーゼ

e = ヒト歯肉繊維芽細胞コラゲナーゼ

#### 実施例 4 6

##### 脈管形成抑制

ウォーカー256癌肉腫；ラット悪性腫瘍の粗抽出物(30mg/ml蛋白質)をハイドロン(Hydron)；緩放出性ポリマーに直径1.5mmのペレット内で結合させた。ペレットを麻酔下の白子(albino)ラットの角膜の間質中に埋没した。カニユーレを下大静脈にゆっくりと埋没させ、そのカニユーレを通して化合物5Aの55%DMSO／水溶液溶液(10mg/ml)を継続的に0.8ml／24時間の割合で6日間注入した。対照群にはDMSO溶液のみを投与した。6日後動物を再麻酔し、角膜血管を目に見えるようにするためにインディアインクで動脈内灌流した。ついで眼球を摘出し、5%ホルマリンで固定した。DMSO溶液のみを投与された対照群の眼球では、角膜輪部からペレット方向に大きい血管成長が観察された。化合物5Aを投与された動物では、対照群と比べて血管は顕著に短くおよび／または顕著に細密であり、インクで殆ど充填されていない。

## 実施例 47

### 乾癬の治療

乾癬に対する化合物 5 A の効果をホルボールエステル誘発表皮過形成マウスモデルで検討した。抗増殖剤のスクリーニング用モデルとして広く認められている 12-O-テトラデカノイルホルボール-13-アセテート(TPA)過形成モデルを選択した。TPAの単発局所投与により、乾癬で観察されるような顕著な表皮過形成と、強い炎症性反応がマウスに生じる(アグリス、T. S. (1980)、Am. J. Pathol. 98 : 639~648頁)。

このモデル系では、TPA投与から3~5日目に表皮過形成が組織学的に明らかに見られる。TPAの他、他のもっと安定なホルボールエステルでもホルボール-12, 13ジブチロイル(Pdibu)も含めて同様の結果が生じる。

本発明化合物の効果を調べるために上記の表皮過形成動物モデルで下記の実験を行った。

ホルボールエステル、Pdibu(20 nmol)のアセトン20  $\mu$ l溶液を無毛マウス(h/h)の両耳(各々約1 cm<sup>2</sup>)に塗布した。ついで試験化合物(総量20  $\mu$ l)をPdibu塗布後直ちに(15~30分後に)右耳に塗布した。各動物の左耳には同量(20  $\mu$ l)のビヒクルを塗布した。試験化合物(およびビヒクル)をPdibu塗布から6~18時間後に再塗布した。処理時間は正確な時間間隔があくように適当にずらした。Pdibu塗布から30時間後、動物を麻酔し、耳の厚さ値をマイクロカリパスを用いて測定した。ついでパンチバイオプシー(6 mm)の重さを測定した。組織検査を30時間目に採取して選択した検体で行った。

試験化合物は、化合物 5 A (10 mg/mlエタノール溶液)、負対照、アセトヒドロキサム酸(AHA ; 2 mg/mlエタノール溶液)および正対照としてフルオシノニド(Lidex<sup>®</sup>) (0.05%アルコールビヒクル(35%)溶液、ジイソプロピルアジペート、クエン酸およびプロピレングリコール)を用いた。

各動物の左耳をビヒクル-処理対照(Pdibu+エタノール)とした。つまり、この実験系の対照としては、1)未処理対照、2)Pdibuおよびビヒクルのみ(各試験動物を含む)、3)PdibuおよびAHA、4)正対照としてPdibuおよびLi

dex<sup>a</sup>がある。

結果を表3に示す。

表3

PdiBu-誘発表皮過形成に対する化合物5Aの効果

耳厚：

化合物5A(0.51  $\mu\text{mol}/\text{耳}$ ; 10 mg/ml溶液20  $\mu\text{l}$ (200  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ))の、3時点(0.25、6.0および24時間)での局所投与により、PdiBu-誘発耳厚は有意に抑制された。

	厚さ( $\text{mm} \times 10^{-3}$ )	対照からの%	n
対照 (未処理 <sup>a</sup> )	13.3 $\pm$ 0.1	(100%)	12
PdiBu+ ビヒクル	30.4 $\pm$ 2.1	229%	8 <sup>b</sup>
PdiBu+ 化合物5A	18.6 $\pm$ 1.6	140%	8 <sup>b</sup>

皮膚バイオブシー重量：

化合物5A(各0.51  $\mu\text{mol}/\text{耳}$ を2時点；0.25および24時間目)の局所投与により、PdiBu-誘発パンチバイオブシー(6 mm)重量増加は有意に抑制された。

	重量(mg)	対照からの%	n
対照 (未処理 <sup>a</sup> )	9.2 $\pm$ 0.2	(100%)	12
PdiBu+ ビヒクル	22.9 $\pm$ 1.8	249%	7 <sup>c</sup>
PdiBu+	13.4 $\pm$ 1.5	146%	7 <sup>c</sup>

## 化合物5 A

- a 未処理対照値は3実験から集めた。
- b 結果は3実験の平均±S. E.を示す(6時間目での投与は省略した)。
- c 結果は3実験の平均±S. E.を示す(6時間目での投与は省略した)。

組織学：

染色した皮膚検体の分析により、化合物5 Aの局所投与によりP di Bu-誘発の下記症状が抑制されたことが判明した。

- 1)炎症性細胞の真皮および表皮への移住；
- 2)赤血球の血管外流出；
- 3)表皮過形成；そして
- 4)表皮形態学的にさらに正常な見かけとなること(つまり、P di Bu-誘発不全角化の減少、および不全類基底細胞、棘細胞および顆粒細胞形および分布の減少)

注)：組織学的分析は耳と同様の結果の側腹部検体の両者で行った；両方に20 nmolのP di Buを投与；しかし耳には20  $\mu$ lの6001(200  $\mu$ g)を約1 cm<sup>2</sup>の面積に投与し、一方側腹部は約4 cm<sup>2</sup>の面積に50  $\mu$ l(500  $\mu$ g)を投与した。皮膚検体は標準組織学的方法で調製し、ヘマトキシリン/エオシンで染色した。

図1はP di Bu(パネルA)あるいはP di Buおよび化合物5 A(パネルB)にさらしたマウスの皮膚の典型的な断面を示す。化合物5 AがP di Bu-誘発表皮過形成を完全に抑制していることは明らかである。

AHA対照：

AHA(0.53  $\mu$ mol/耳を3時点(0.25、6.0および24時間)の局所投与により、P di Bu-誘発耳厚増加とバイオプシー重量の増加は変化しなかった。

	厚さ(インチ×10 <sup>-3</sup> )	重量	n
対照 (未処理 <sup>d</sup> )	13.3±0.1	9.2±0.2	12
P di Bu+ ビヒクル	35.5±1.3	25.9±0.8	6 <sup>e</sup>
P di Bu+	36.8±1.3	24.1±1.2	6 <sup>e</sup>

## A H A

d 未処理対照群の値は3実験から集めた。

e 結果は2実験の平均±S. E.を示す。

正の対照：

Lidex<sup>®</sup>(フルオシノニド)はPdiBu-誘発耳厚増加とバイオブシー重量増加を有意に抑制した。

	厚さ	重量	n
対照 (未処理) <sup>f</sup>	13.3±0.1	9.2±0.2	12
PdiBu+ ビヒクル	33.6±1.2	24.4±1.1	6 <sup>g</sup>
PdiBu+ A H A	15.8±0.4	9.7±0.3	6 <sup>g</sup>

f 未処理対照群の値は3実験から集めた。

g 結果は1実験の平均±S. E.を示す。

要するに、化合物5Aは強い抗炎症作用をこの乾癬用標準インビボモデルにおいて示した。抗炎症作用の強さは正対照であるLidex<sup>®</sup>で観察されるそれと匹敵するくらいであった。PdiBu-誘発耳重量の減少は、耳厚増加の同様の抑制を伴った。さらには、抑制された炎症および表皮過形成は組織学的分析により証明された。アセトヒドロキサム酸(A H A)はMMPに対する抑制作用が欠けているので負の対照として用いた。耳厚あるいは重量に対するPdiBu-誘発効果を変化させなかった。

実施例48慢性真皮創傷の治療

ある種の創傷における間質メタロプロテイナーゼ活性の存在、および本発明抑制剤による該プロテアーゼ活性の抑制を示すために実験した。

閉鎖性自然治癒創傷、解放性遅延治癒創傷および解放性慢性創傷と呼ばれる3タイプのヒト創傷から流体を集めた。最初の分類では、乳房切断手術後の女性の

胸壁から流体を集めた。効果的な外科的理由により開放したままで置かれた非感

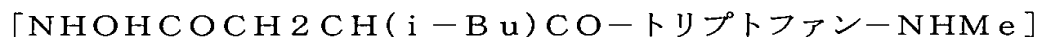
染創傷からの流体は開放性遅延治癒創傷と見なした。密封包帯を創傷部にし、密封から2～6時間後に流体を集めた。最後に、慢性開放性創傷からも創傷部を密封包帯で覆うことにより流体を集めた。臨床的に感染していず、開放されたままできて、4週間以上治癒していない場合の創傷を慢性と見なした。

種々の創傷流体の間質メタロプロテイナーゼ活性を、シャビラら、Analytic Biochemistry(1984)、136:446に基本的に詳述のアゾコール(Azoco 11)分析法を用いて測定した。

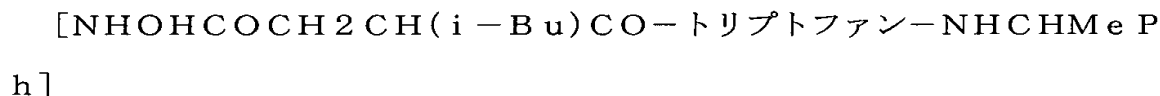
流体は遠心分離し、上清液を0.45 μ 滅菌ゲルマンフィルターを用いて濾過した。濾液をプロテアーゼ活性測定時まで-80℃で凍結保存した。

創傷流体中に存在するプロテアーゼ活性に対する4抑制剤の効果を測定した。抑制剤は、

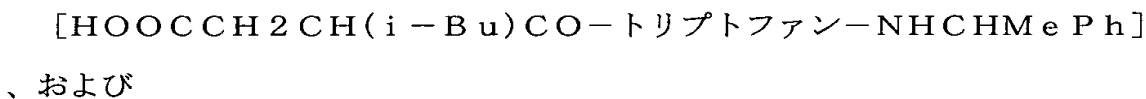
化合物5A



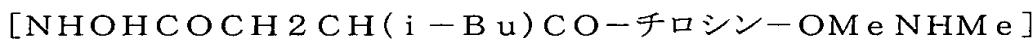
化合物21A



化合物39A



化合物S1029



これらの抑制剤をある種の他の抑制剤と比較し、それらはペプチドインターナショナルから入手したUL001  $[\text{HSCH}_2\text{CH}(\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2)\text{CO-Ph-e-Ala-NH}_2]$  と、エラスチンプロダクツから入手したMP506である。EDTA(エチレンジアミンテトラ酢酸)およびPMSF(フェニルメチルスルホニルフルオリド)も試験した。

4種の抑制剤の保存溶液はすべて800 μg/ml濃度で調製した。抑制剤の溶解性の違いにより、異なる方法を用いた。化合物5Aは温プロピレングリコール

に最終濃度が2.4%になるように溶解し、ついで0.05%メチルセルロース含有10mMクエン酸、pH5.5に溶解した。化合物S1029は1%DMSOに溶解し、ついで0.05%メチルセルロース含有10mMクエン酸pH5.5に溶解した。化合物39Aはプロピレングリコールに最終濃度が2.4%になるよう溶解し、ついで1mM塩化カルシウム、50mMトリス-C1、pH7.8に溶解した。化合物21Aはプロピレングリコール(2.4%)、メチルセルロース(0.05%)および10mMクエン酸、pH8に溶解した。

プロテアーゼ基質アゾコールはシグマ社(Sigma Chemical Corporation)から入手し、これはコラゲナーゼ/ゲラチナーゼ様メタロプロテイナーゼ酵素と一般的なプロテアーゼの基質である。クロストリジウム ヒストリチカム(*Clostridium histolyticum*)コラゲナーゼ(酵素の粗形態)はワーチントンバイオケミカルズ社(Worthington Biochemicals)から入手した。TRIS緩衝液、DMSO、塩化カルシウム等の一般化学物質はシグマ社から入手した。

要約すると、アゾコール基質の緩衝液(1mM塩化カルシウム含有、50mM TRIS、pH7.8、5 $\mu$ g/ml溶液)懸濁液900 $\mu$ lを1.5mlのマイクロ遠心分離試験管に加え、ついで抑制剤(あるいは緩衝液)50 $\mu$ lと50 $\mu$ lの慢性創傷流体(あるいはコラゲナーゼ標準)を反応管に加えた。反応管を37℃で振盪器に入れ、毎分30回の割合で試験管を振盪させた。24時間インキュベーション後、反応試験管を10,000 $\times$ gで遠心分離し、上清液の520nmでの吸光度をミルトンローイ分光光度計で測定した。アゾコール基質の蛋白分解により、不溶性のアゾコール基質から可溶性の着色したフラグメントが生じた。創傷流体検体は単独であるいは抑制剤と共にインキュベートした。対照として、測定用緩衝液とアゾコール基質とを共にインキュベートし、基質の自然退化を測定した。アゾコール基質の分解の標準曲線をアゾコールと粗細菌由来コラゲナーゼとを共にインキュベートして得た。プロテアーゼレベルは慢性創傷流体1mlあたりのコラゲナーゼ

当量の正味の $\mu$ gで表した。図中、ある種の創傷流体は個人の名前で呼ぶ。

図2にその結果を示す。手術後1～7日後に集めた乳房切除手術の流体検体は



、創傷流体 1 ml あたり平均  $0.75 \pm 0.06 \mu\text{g}$  当量のコラゲナーゼ活性であり、低いプロテアーゼ活性を示した。これに比較して、図 3 から、開放性創傷から集めた創傷流体は創傷流体 1 ml あたり平均  $1.99 \pm 0.59 \mu\text{g}$  当量のプロテアーゼ活性を示した。慢性創傷から集めた流体は、平均  $1.25 \pm 0.95 \mu\text{g/ml}$  のプロテアーゼ活性を示した。慢性あるいは開放性創傷からの 13 流体検体中唯一 L. スミスのみが測定可能なレベルのアゾコール加水分解活性を示さなかった。開放性および慢性創傷からの残り 12 検体ではすべて、乳房切除手術創傷流体中で測定したレベルより高いレベルを示し、 $2 \sim 5.85 \mu\text{g/ml}$  の間であった。

このように、慢性および開放性創傷から集めた流体は乳房切除手術排膿液から集めた流体に比べアゾコール分解プロテアーゼ活性が非常に高いことが明白である。このことより、開放性あるいは慢性創傷のインビボ環境は、創傷の細胞外間質蛋白質分解能を有するプロテアーゼを含有することが明らかである。

種々の創傷流体中のプロテアーゼ活性レベルを確立することにより、3 種のプロテアーゼ抑制剤の効果を測定した。図 4 の結果から、化合物 5 A は  $40 \mu\text{g/ml}$  ( $100 \mu\text{M}$ ) あるいは  $4 \mu\text{g/ml}$  ( $10 \mu\text{M}$ ) の最終濃度で添加した時に、慢性創傷流体によるアゾコールの蛋白質分解を効果的に (初期の蛋白質分解活性の約 96%) 抑制した。低濃度の化合物 5 A [ $4 \mu\text{g/ml}$  ( $1 \mu\text{M}$ ) および  $0.4 \mu\text{g/ml}$  ( $0.1 \mu\text{M}$ )] は、非処理プロテアーゼレベルの約 92% を抑制した。メタロプロテイナーゼの非特異的抑制剤である EDTA の添加により、プロテアーゼ活性は効果的に減少した (約 96% 抑制)。しかしながら、化合物 5 A の効果的濃度は、EDTA の濃度が mM 単位であるのに対して  $\mu\text{M}$  である。セリンプロテアーゼの非特異的抑制剤である PMSF の添加 ( $500 \mu\text{M}$  濃度) によっても約 65% の蛋白質分解活性は減少した。低濃度 ( $500 \mu\text{M}$  あるいは  $50 \mu\text{M}$ ) の PMSF では、実際にはプロテアーゼ活性レベルが僅かに上昇した。図中の CW はプロテアーゼ抑制剤で処理していない創傷流体を表す。

要するに、化合物 5 A および EDTA 両者は慢性創傷流体のプロテアーゼ活性を効果的に抑制するが、化合物 5 A は EDTA よりさらに強力であった。PMSF は高濃度以外では効果的な抑制剤ではなかった。このことから、慢性創傷流体

中に存在する蛋白質分解活性の多くはメタロプロテイナーゼに因ることを示している。高濃度のPMSFで観察された抑制は主に、PMSFの高濃度で報告されている非セリンプロテアーゼの非特異的抑制によるものと思われた(例えば、Arch. Biochem. Biophys. 124 : 70 参照)。

開放性および慢性創傷に対するある種の抑制剤の効果を確認するためにさらに実験を行い、その結果を図5に示す。PMSFが創傷流体の蛋白質分解活性を有意に減少しないのに対して、化合物5AおよびEDTAは非常に効果的な抑制剤であった。

要約すると、化合物5AとEDTAは一貫して高レベルのアゾコール分解プロテアーゼ活性をもつ開放性または慢性創傷流体中の蛋白質分解活性を95%減少させた。PMSFは蛋白質分解活性レベルを減少させなかった。このことは、開放性および慢性創傷は一貫して間質メタロプロテイナーゼレベルを増大させ、それを化合物5Aは効果的に抑制し得るという一般的概念をサポートする。

一連の間質メタロプロテイナーゼ抑制剤の、損傷流体によるアゾコール蛋白質分解に対する効果を測定するためさらに実験を行った。この実験では、化合物5A、化合物S1209、UL001およびEDTAが損傷流体の蛋白質分解活性を非常に効果的に抑制した。例えば、これらの抑制剤はクリスティ損傷流体の蛋白質分解活性を97%~94%減少させた(損傷流体1mlあたり、404 $\mu$ gコラゲナーゼから9~18 $\mu$ gコラゲナーゼまで)。しかしながら、MP506は実質的には他の抑制剤に比べ効果が小さかった。開放性および慢性損傷4検体中3検体でMP506はプロテアーゼ活性を減少させなかった。図6はこの結果を総括している。

上記の結果から、化合物5Aおよび化合物S1209は多くの損傷流体中のアゾコール分解プロテアーゼの非常に効果的な抑制剤である。MP506は化合物

5Aあるいは化合物S1209と比べいくらか効果が少ない。

最後に、化合物5A、化合物21A、化合物39Aおよび化合物S1209の、慢性創傷流体中に存在するプロテアーゼ活性に対する効果を確認するために実験を行った。

これらの実験のために、抑制剤の溶解性の違いにより異なる方法を用いた。化合物5 Aは温プロピレングリコールに最終濃度が2.4%になるように溶解し、ついで0.05%メチルセルロース含有10mMクエン酸、pH 5.5に溶解した。化合物S 1 0 2 9は1%DMSOに溶解し、ついで0.05%メチルセルロース含有10mMクエン酸pH 5.5に溶解した。化合物3 9 Aはプロピレングリコールに最終濃度が2.4%になるよう溶解し、ついで1mM塩化カルシウム、50mMトリス-C 1、pH 7.8に溶解した。化合物2 1 Aはプロピレングリコール(2.4%)、メチルセルロース(0.05%)および10mMクエン酸、pH 8に溶解した。

図7に示すように、慢性創傷流体は損傷流体1mlあたり平均 $284 \pm 52 \mu\text{g}$ コラゲナーゼ当量の高レベルのプロテアーゼ活性を包含していた。 $800 \mu\text{g}/\text{ml}$ の化合物5 Aの添加により、創傷流体1mlあたり $45 \pm 1 \mu\text{g}$ コラゲナーゼ当量まで84%プロテアーゼ活性が減少した。低濃度の化合物5 Aの添加では、創傷流体1mlあたり $90 \pm 6 \mu\text{g}$ コラゲナーゼ当量のプロテアーゼ活性で、わずかに高いレベルとなった。化合物2 1 Aおよび化合物S 1 2 0 9もまた効果的に慢性創傷流体中のプロテアーゼ活性を抑制し、最高濃度( $800 \mu\text{g}/\text{ml}$ )では各々94%および70%抑制した(表3参照)。これに対し、化合物3 9 Aは最高濃度でさえ、プロテアーゼ活性をわずか23%のみ抑制し、 $8 \mu\text{g}/\text{ml}$ および $0.8 \mu\text{g}/\text{ml}$ 濃度では各々13%と30%の増加が見られた。

要するに、最高濃度で3抑制剤すべてがアゾコールの蛋白質分解を減少させる。しかしながら、化合物3 9 Aは化合物5 A、化合物2 1 Aあるいは化合物S 1 2 0 9に比べ有意に活性が弱く、低濃度の化合物3 9 Aは実際には慢性創傷流体の蛋白質分解活性レベルを上昇させた。

#### 実施例 4 9

##### チオグリコレート誘発腹膜炎分析

腹腔内の好中球のチオグリコレート誘発浸潤予防に対する化合物5 Aの効果を下記手順で測定した。

6～8週令Balb/c雄マウスを用いた(各処理群および対照群あたり $n = 10$ )

。チオグリコレート懸濁液(脱イオン水1リットルあたり5.9 g)を色が金色になるまで煮沸し、ついでピンク色になるまで冷却した。洗浄溶液は、0.1%ウシ血清アルブミン(100 mg/100 ml)と5 Uヘパリン/mlを含有した食塩水からなる。

チオグリコレート(1 ml/動物)をT=0時に腹腔内注射(i. p.)した。化合物5 A(800  $\mu$ g/ml、1 ml/動物)をチオグリコレート注射後T=0.5、1.0および2.0時間目に腹腔内注射した。チオグリコレート投与からT=3.0時間後に細胞を洗浄して集めた。動物はCO<sub>2</sub>窒息により安楽死させ、腹部皮膚を外科用ハサミで切断して腹腔をさらした。洗浄溶液5 mlを腹膜中に注射し、しずかにマッサージして懸濁液を調製した。溶液をシリンジで除き、注射した溶液の約80%を回収した。洗浄溶液中の総細胞数をコールターカウンターで計測した。

化合物5 Aで処理したマウスの腹膜中の平均細胞数は、ビヒクルのみを注射したマウスの腹膜中の平均細胞数より有意に減少していた( $p=0.0141$ )。図8はチオグリコレート誘発腹膜炎分析における抑制剤5 Aの効果を示す。

#### 実施例 50

##### C 57マウスにおける転移分析

この測定はC 57マウスにおけるインビボ実験的転移分析での化合物5 Aの抗転移力を測定するために行った。シモンセンラボラトリーズ(Simonsen Laboratories、ギルロイ、カルフォニア)より入手した雌C 57 BL/6マウス、4~6週令(15~20グラム)を本実験に用いた。

B 16-F 10マウス黒色腫をアメリカ・タイプ・テッシュ・カルチャー・コレクションから入手し、DMEM(Dulbecco's modified eagles培地)+10%

ウシ胎児血清中でプラスチック組織培養フラスコ中、湿式5%CO<sub>2</sub>インキュベーター中、37℃で日常的に継代培養した。B 16-F 10腫瘍細胞をトリプシン-EDTA(エチレンジアミン-テトラ酢酸)で剥がし、PBS(リン酸緩衝食塩水、2回)で洗浄し、 $5 \times 10^5$ 個細胞/ml濃度に懸濁し、注射の前に氷上に保存した。 $5 \times 10^4$ 個細胞(0.1 ml)を動物に静脈内注射して攻撃した(処理群あたり10動物)。動物は処理群に割り当てられる前に無作為に分散させた。

腫瘍細胞攻撃の24時間前に、化合物5A懸濁液(濾過滅菌カルボキシメチルセルロース中4%(w/v)懸濁液、0.1ml)あるいは懸濁ビヒクルをC57BL/6マウスの腹膜(ip)中に注射した。攻撃の30分前に動物に化合物5Aあるいは懸濁ビヒクルを投与し、注射前30分間室温でインキュベート後、50000個のB16-F10腫瘍細胞の化合物5Aのオフタルミンビヒクル溶液(800 $\mu$ g/ml)あるいはオフタルミンビヒクルのみの溶液を静脈注射した。その後動物に化合物5A(150mg/kg/d, ip)懸濁液あるいはビヒクルをさらに4日間投与した。

種々の処理群の動物の生存時間を記録し、その結果をカイニ乗検定を用いて評価した。

分析結果を図9に示す。化合物5Aで処理したマウスの生存数は、ビヒクル処理群と比し有意に35~37日目で増加している( $p < 0.05$ )。

#### 実施例51

##### 非ヘパリン化動物における低血液量性ショックに対する化合物5Aの効果

外傷性出血および蘇生後の心血管機能、肝細胞機能および微細循環に対する化合物5Aの効果を調べるためにこの実験を行った。

この実験は、非ヘパリン化動物において出血によるショック後の蘇生の間に、全身投与(静脈注射、輸液または他の適当な投与法)した時の、低血液量性ショックの治療におけるメタロプロテアーゼ抑制剤に関する。シャウドリーら、Circ. Shock(1989)27:318参照。化合物5Aはリンゲル乳酸塩溶液の100 $\mu$ g/ml濃度の懸濁液で調製した。

SD(Sprague-Dawley)ラット(体重;約300g、各群6匹、シャム、食塩水および化合物5A)を軽くエーテル麻酔し、種々の血管に実験のためカニューレを通した(ウォングら、Am. J. Physiol. (1990)259:R645)。出血後、リンゲル乳酸塩溶液(最大出血量 $\times$ 3)を45分間かけて投与し、リンゲル乳酸塩溶液(最大出血量 $\times$ 2)をさらに60分間かけて投与した。化合物5A懸濁液の1投与量(0.75ml、40mg/ml)を3 $\times$ リンゲル乳酸塩溶液の投与完了後皮下注射した。化合物5A(0.1mg/ml)含有リンゲル乳酸塩溶液を2回輸液蘇生

の2回目分として与えた(総投与量: 体重1 kgあたり約107 mg)。疑似手術(sham-operated)動物に血管カニューレし、正中線切開した。しかし、出血と蘇生は導入されなかった。これらのラットは化合物5 Aを投与されなかった。食塩水処理群は外傷性出血と輸液蘇生およびビビクル(正常食塩水と同量)処理を受けた。

リングル乳酸塩溶液蘇生完了後2時間および4時間目に、下記のパラメーターをモニターした。

- (1) 肝細胞機能(インドシアニングリーン浄化に伴う $K_d$ および $V_{max}$ (図10 AおよびB)、ウォング、Pら、Am. J. Physiol. (1990) 259: R645、ウォング、Pら、J. Surg. Res. (1990) 48: 464) ;
- (2) 平均動脈血圧(MAP)および心拍数(HR)(図11 AおよびB) ; 心臓機能(ウォングPら、J. Surg. Res. (1991) 50: 163)、{心拍出量(CO)、心拍量(SV)および総抹消抵抗(TPR)図12 A、BおよびC} ; および
- (4) 肝臓、腎臓、脾臓および小腸内の微小血管血流(MBF)(各々図13 A、B、CおよびD)。図10~13中、データは(1)疑似手術(正対照)、(2)食塩水処理(負対照) および(3)化合物5 A処理群の3つの異なる実験群でのものである。

肝細胞機能は、 $K_d$ および $V_{max}$ が能動輸送率と浄化速度に夫々相関しているインドシアニン浄化力学を用いてモニターした。蘇生を開始してから2時間目の最大浄化速度( $V_{max}$ 、図10)は、化合物5 A処理群では食塩水群より有意に高く、シャムレベルの約85%であった。効果はわずかに減少していたが、しかし4時間目でも有意に、食塩水処理群動物のその2倍であった。化合物5 A処理群の

2時間目の能動輸送率( $K_d$ )はシャム群および食塩水群に比べ高かった(150~160%)。化合物5 A処理群の4時間目では、シャム群に近い値まで減少したが(125%)、食塩水処理群の約3倍の値であった。これらの結果より、食塩水群に比し肝機能が改善することがわかる。

化合物5 A群の心臓機能は食塩水処理の負の対照動物に比し、改善されていた。化合物5 Aと食塩水処理動物の平均動脈血圧(図11 A)は有意な差異がなく、

シャム群の約60～70%であった。3つの実験群すべての心拍数(図11B)は殆ど同じであり、これは攻撃も治療もいずれも心拍数に影響を与えていないことを示している。化合物5A処理群の心拍出量(図12A)は食塩水群に比し有意に亢進し、シャム群の約80%であった。同様に、化合物5A群の心拍量(図12B)は食塩水群に比し有意に亢進し、シャム群の約85%であった。TPR(図12C)は、化合物5A群では食塩水群あるいはシャム群に対して蘇生後低かった。化合物5A群における食塩水群に比して亢進した心拍出量および心拍量、および低い総抹消抵抗はすべて心臓機能の改善、血液供給の改善および血流に対する抵抗の減少を示している。

微小血管血流(MBF)を図13A-Dに示すように蘇生の開始から2時間および4時間目に測定した。すべてのデータは化合物5A群が食塩水群に比し亢進したMBFをもつことを示している。総体的には、MBFは化合物5Aを用いることによりシャム群の80～100%内まで回復し、一方食塩水群では45～65%であった。化合物5A処理動物の改善された微小血管血流は各器官での組織灌流の改善を示唆する。

この結果から、重篤な出血後の晶質蘇生の間に化合物5Aを投与することにより、輸液蘇生完了後2時間および4時間後での心拍出量、肝細胞機能( $V_{max}$ 、および $K_m$ )および肝臓、腎臓、脾臓および小腸での表面微小血管血流が保持あるいは有意に改善することを示す。化合物5Aでの処理は総抹消抵抗を減少させる。化合物5Aの投与は平均動脈血圧、心拍数あるいは全身ヘマトクリット値に食塩水処理群と比して有意な影響を与えない。つまり、外傷性出血と輸液蘇生後に補助

物として化合物5Aを投与することは、輸血をしない場合でも心臓血管機能と肝細胞機能を有意に改善する。

## 実施例 5 2

### 化合物 5 A の抗再狭窄活性

#### 4 日バルーンカテーテル損傷－化合物 5 A 投与

雄SDラット(3～3.5月令)の総頸動脈にバルーンカテーテル損傷を与えた(

クロウスら、Lab. Invest. (1983) 49: 208~215)。手術の直前、ラット(n=6)に100mg/kgの投与量で化合物5Aを腹腔内注射し(総注射量: 1ml)、別に同量の4%カルボキシメチルセルロースビヒクル(CMC)をラット(n=5)に注射した。ラットに次の4日間100mg/kgの化合物5Aか、CMCビヒクルを毎日投与した。ラットは損傷の4日後殺した。ラットには殺す17時間、9時間および1時間前に、皮下注射で25mg/kgのBrdUを注射し、複製血管平滑筋細胞を標識した。カテーテルを大動脈に挿入し、頸動脈を4%パラホルムアルデヒドで生理的圧力下灌流して固定した。総頸動脈を注意深く切開後、血管をパラフィン中に埋め込み、横断し、抗BrdU抗体とヘマトキシリンで染色し、医学的平滑筋細胞複製の指標を標識SMC%で表す(リンドラーら、J. Clin. Invest. (1992) 90: 2044-2049)。

固定後、総頸動脈を内膜表面を上方に向けて留め、内膜表面に存在する細胞をヒストン蛋白質に対する抗体で染色する。この工程により、表面細胞のみが染色される；抗体は内部弾性ラミナを透過しない。表面細胞の数を測定し、単位面積あたりの細胞数を決定した。化合物5Aの投与によりCMC処理群に比し単位面積あたりの細胞数は有意に減少した(図14)。バルーン損傷から4日目の内膜への細胞移動は大いに減少していた。

#### 10日バルーンカテーテル損傷-化合物5A投与

手術を行い、化合物5Aを上記のように4日-動物に10日間毎日投与した(各群n=5)。動物には殺す前にBrdUを注射し、中膜と内膜中の複製細胞を標識した。損傷から10日後までには、正常血管は肥厚した新内膜を形成する；平滑筋

は内膜に移住し、続く増殖によりこの肥厚が生じる。血管の横断面を切断し、抗BrdUとヘマトキシリンで染色した。内膜横断部面積をコンピューターデジタル化法で測定した。化合物5A投与により内膜横断面積はCMC処理対照群に比し有意に減少した(図15)。内膜細胞複製率は化合物5A投与群では対照群に比し有意に高かった。内膜細胞複製率の増加にもかかわらず、患部の厚さは劇的に化合物5A投与群では減少していて、これは平滑筋の内膜への移住が抑制されたこ



とを示唆している。

すべてのデータは平均±SEMで表され、ステューデントのt検定により分析された。

【図1】

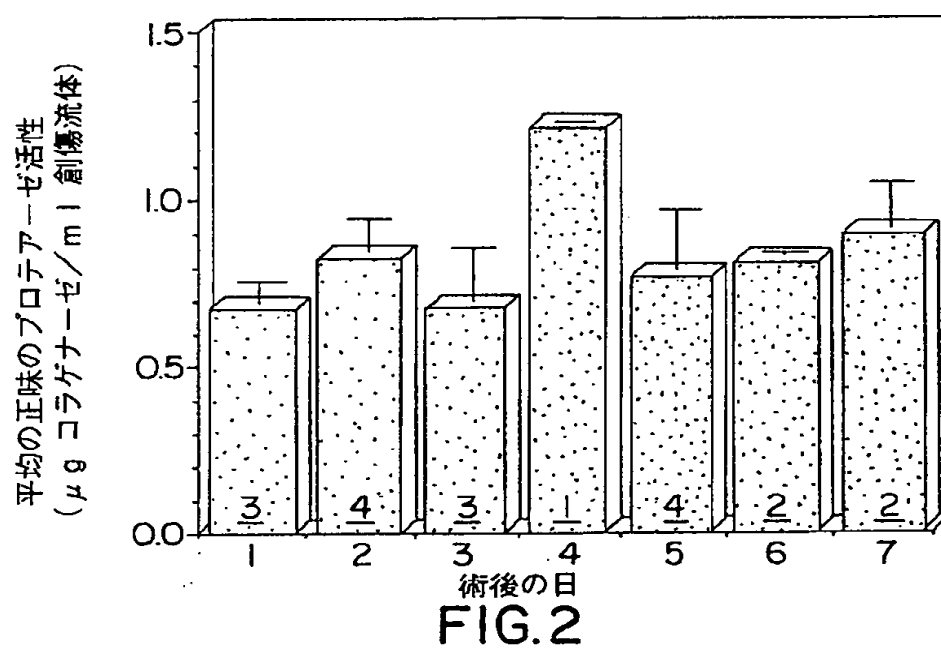


FIG.1A

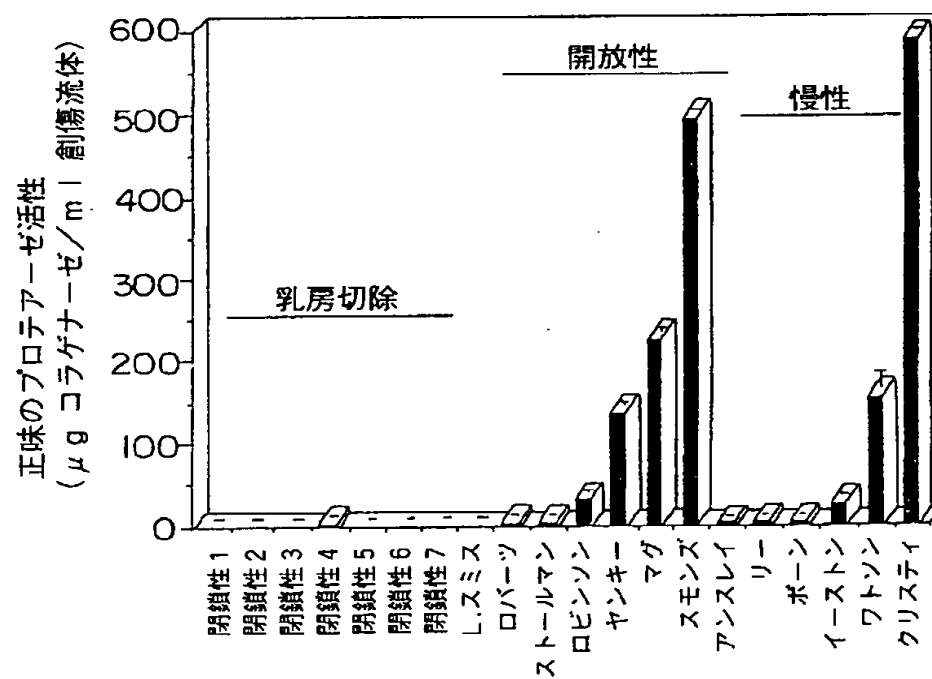


FIG.1B

【図2】



【図3】



【図4】

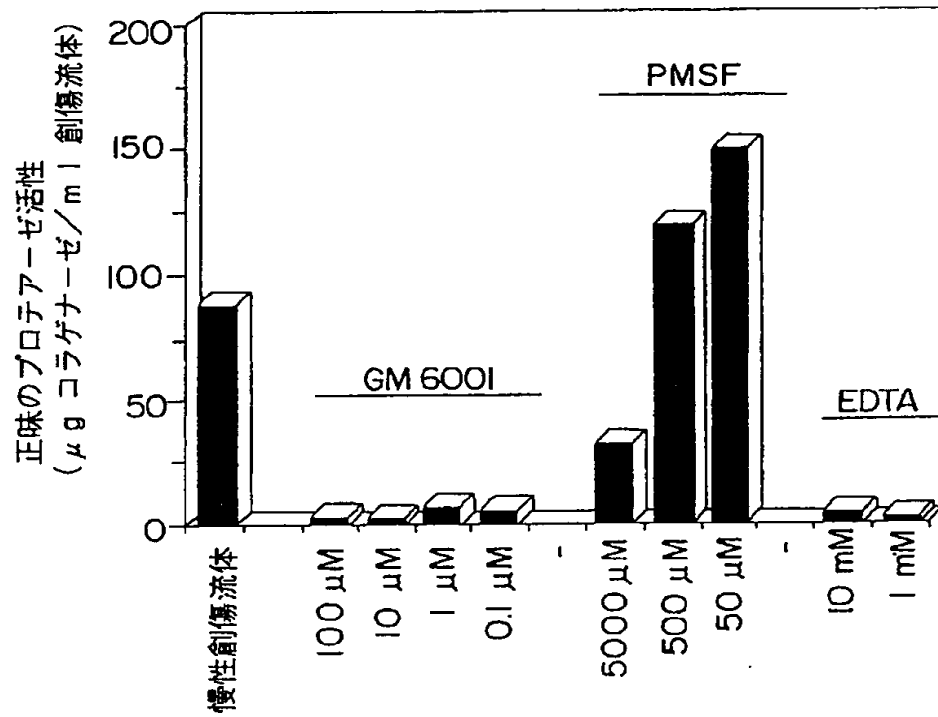


FIG. 4

【図5】

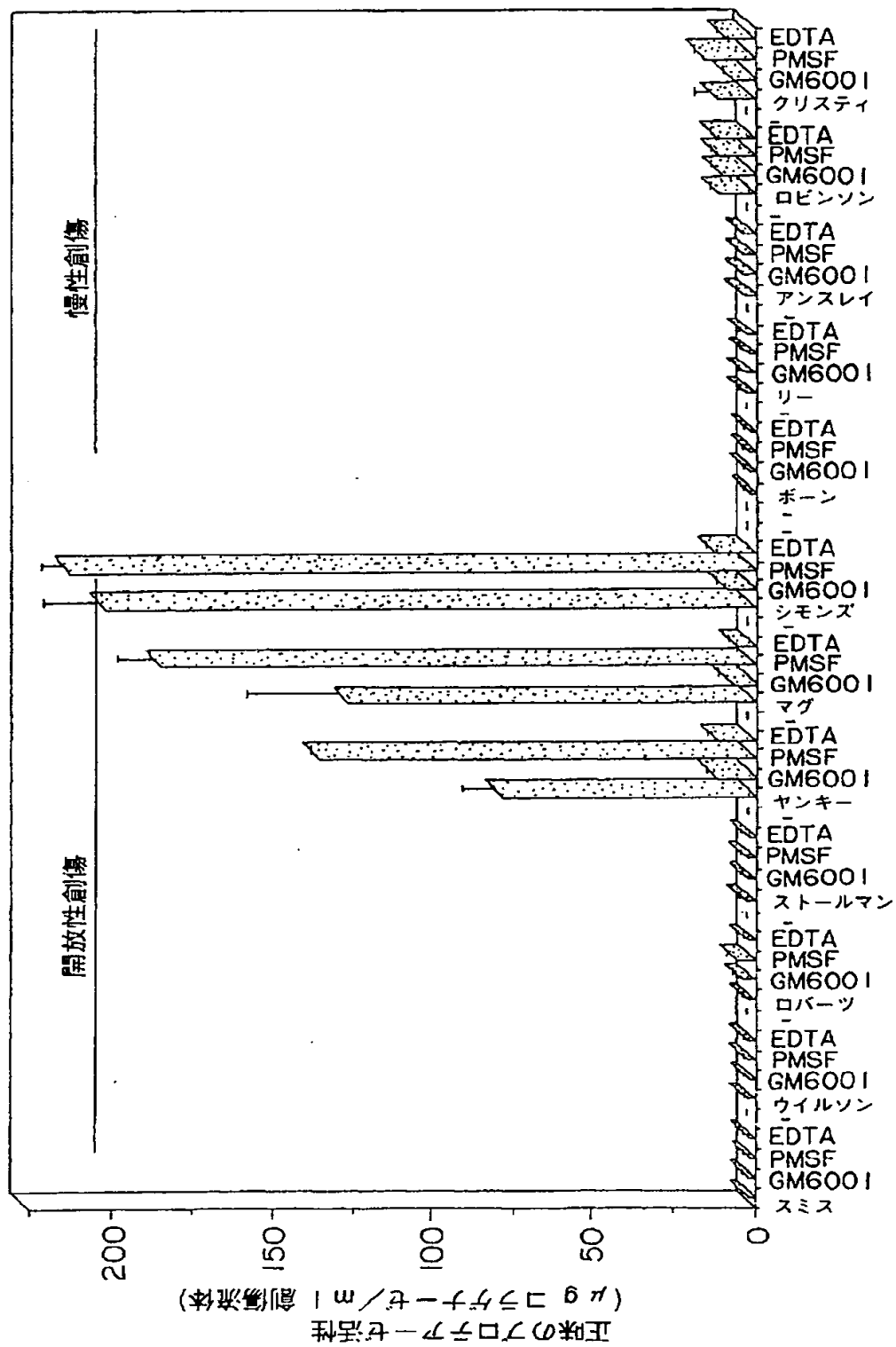


FIG.5

【図6】

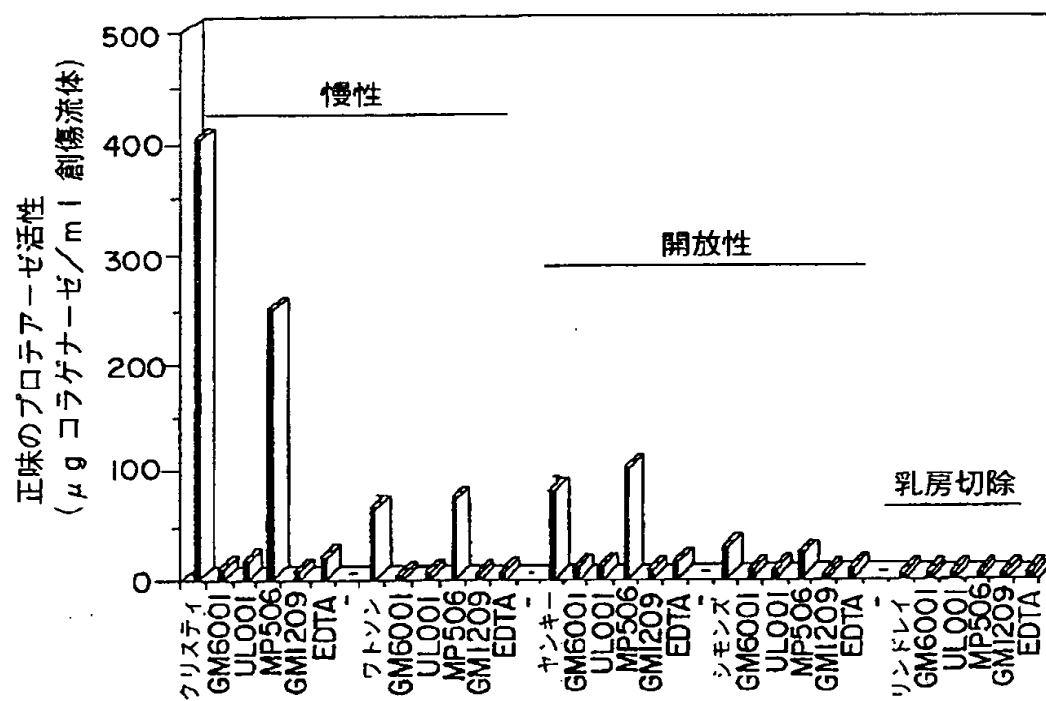


FIG. 6

【図7】

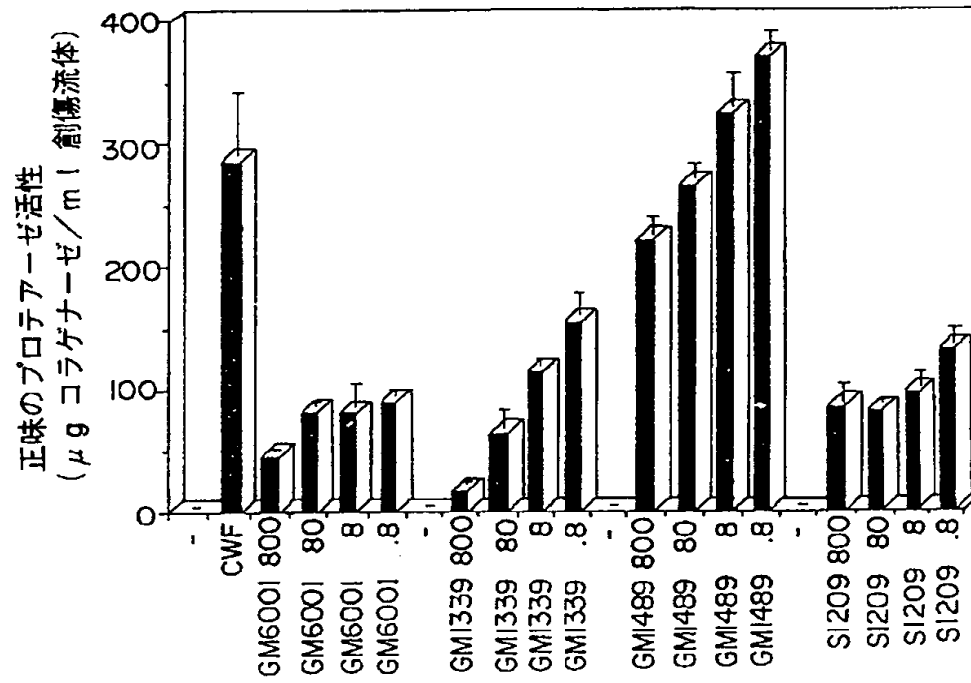


FIG.7

【図8】

チオグリコレートにより誘発された腹膜炎

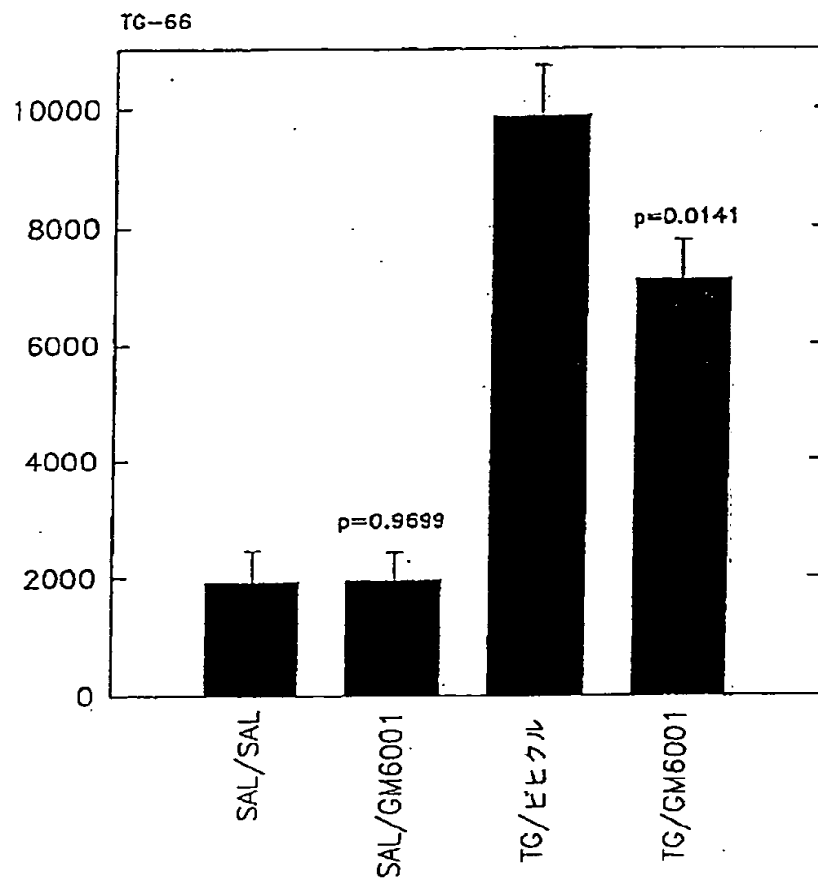
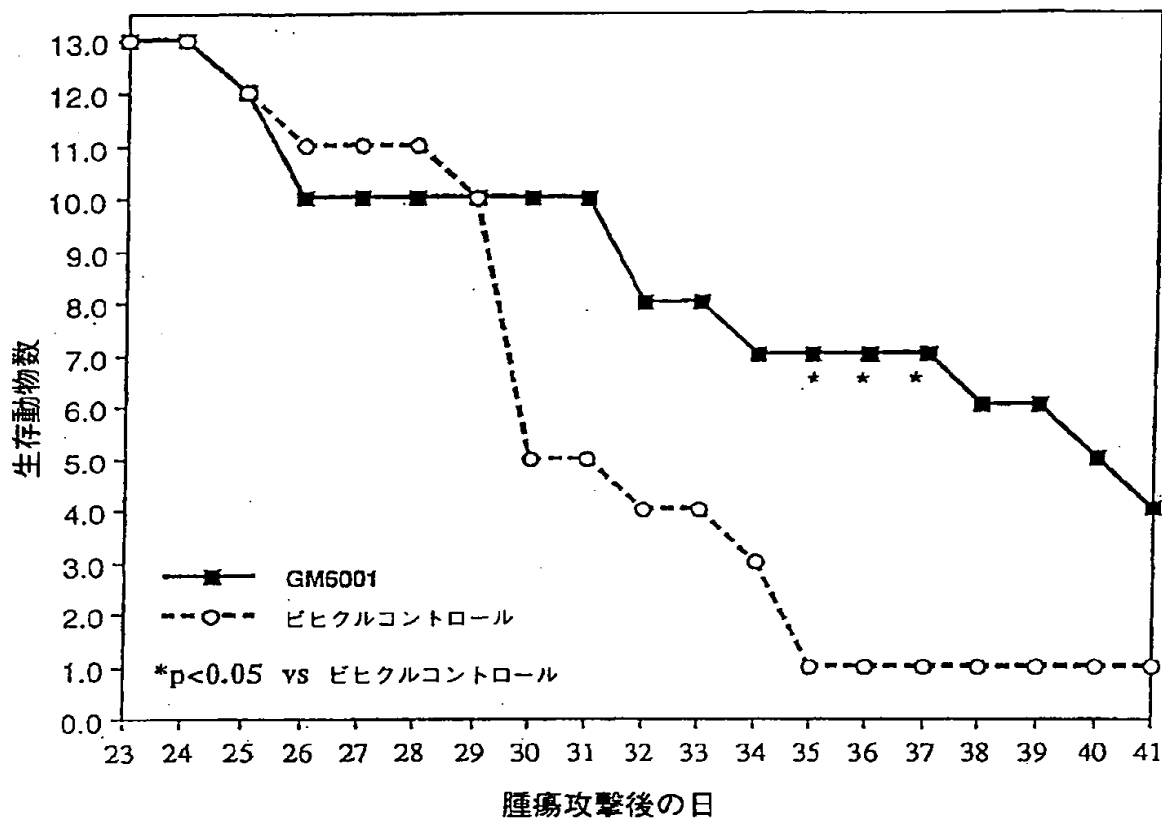


Figure 8

【図9】

マウス黒色腫（B16-F10）モデルにおける  
GM6001の抗転移効果



腫瘍攻撃（50,000細胞/マウス、静脈内）の1～4日後に  
150mg/kg/日のGM6001で腹腔内処理した動物

Figure 9



【図10】

Figure 10A

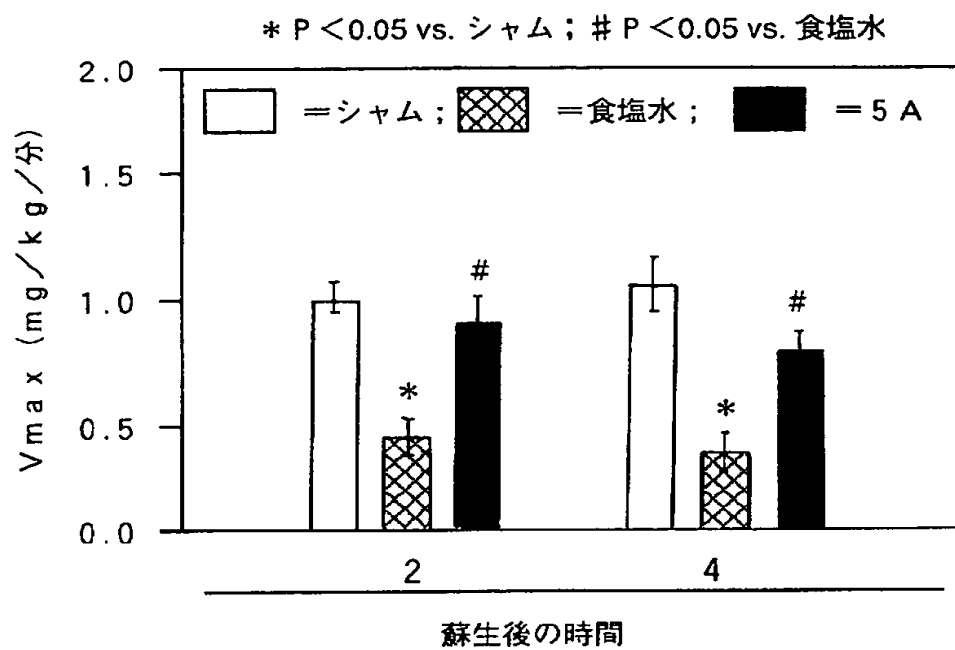
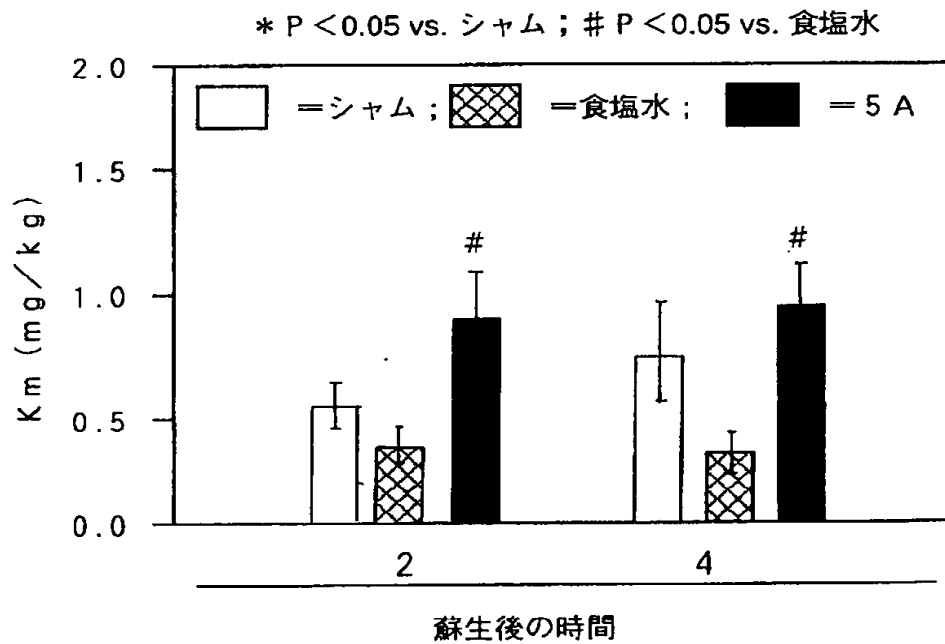


Figure 10B



【図11】

Figure 11A

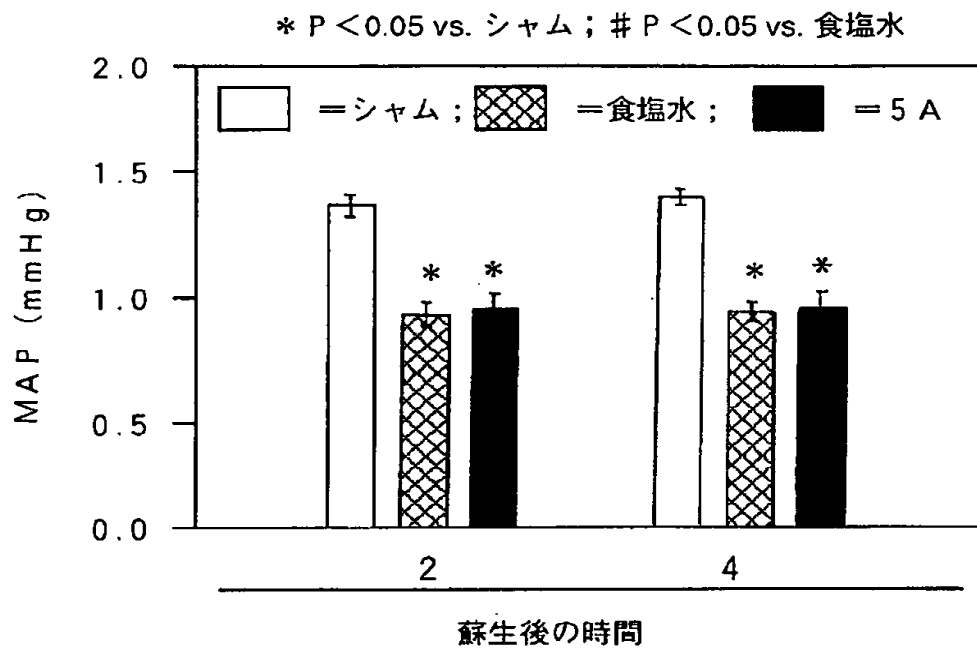
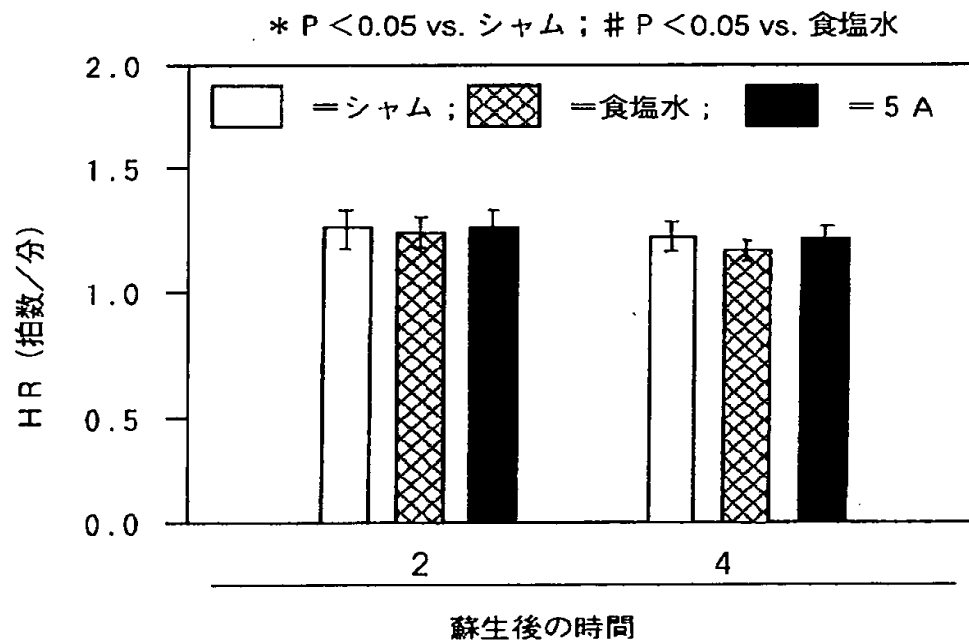


Figure 11B



【図12】

Figure 12A

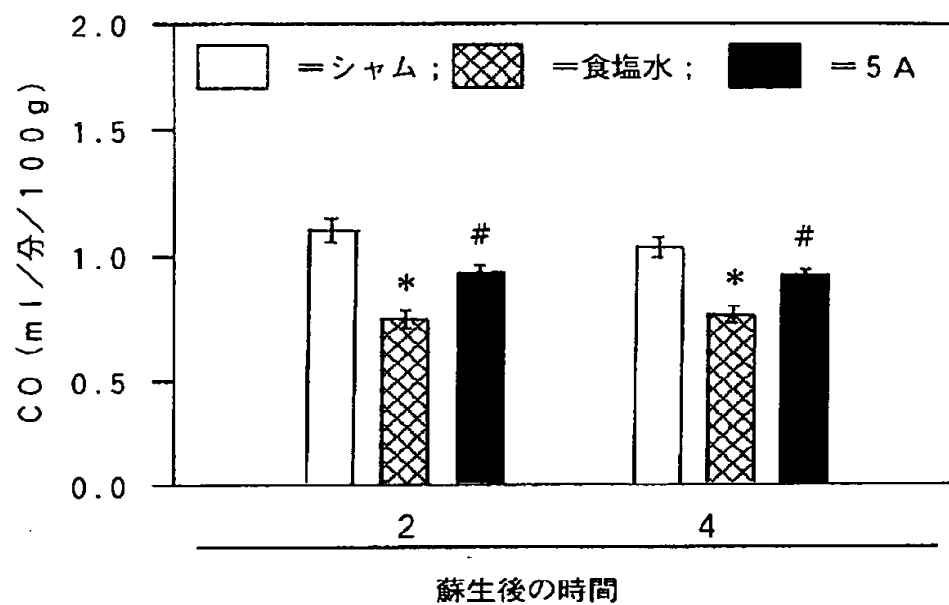
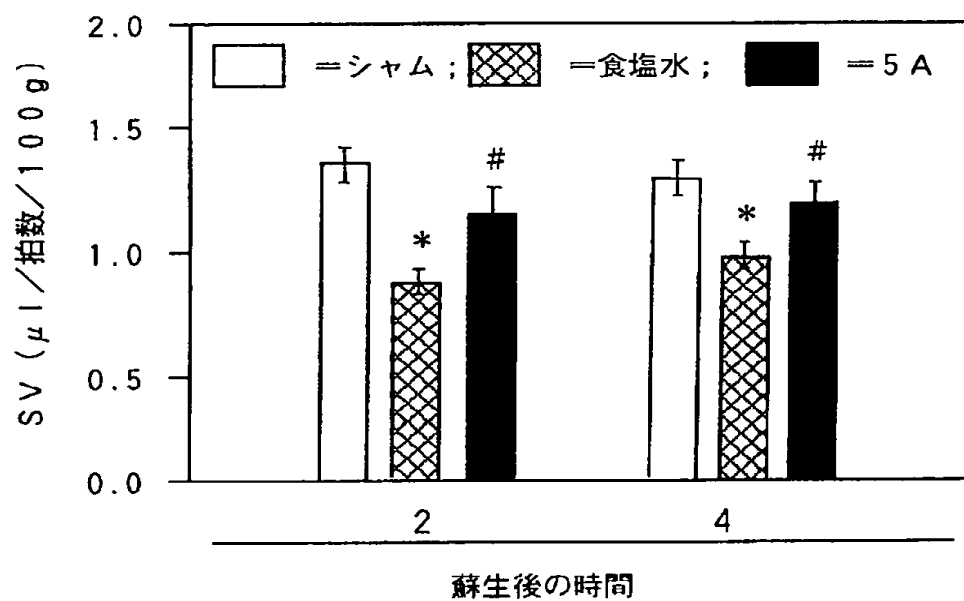
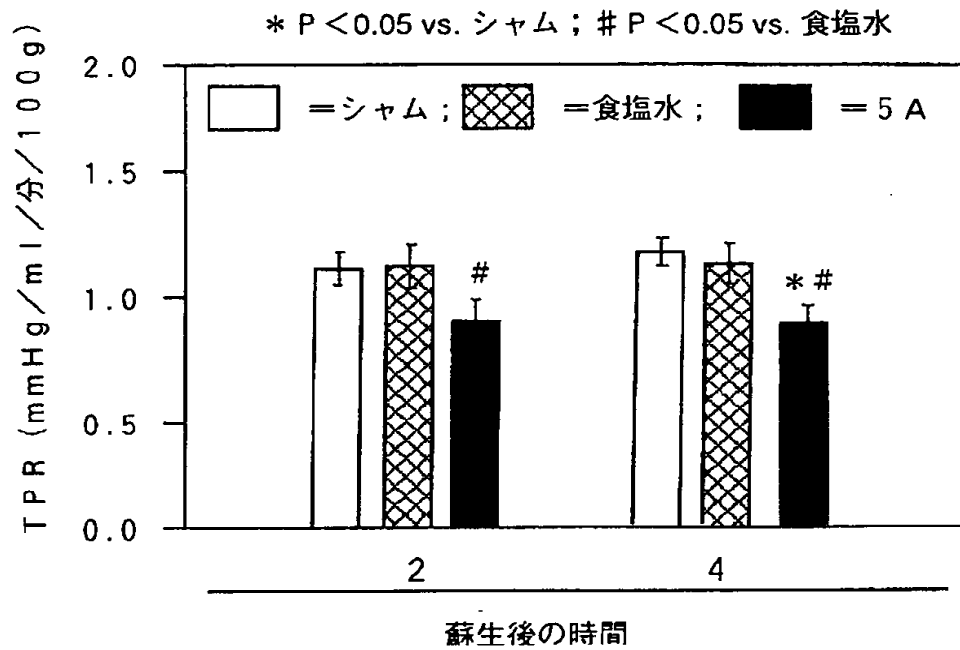
\*  $P < 0.05$  vs. シャム ; #  $P < 0.05$  vs. 食塩水

Figure 12B

\*  $P < 0.05$  vs. シャム ; #  $P < 0.05$  vs. 食塩水

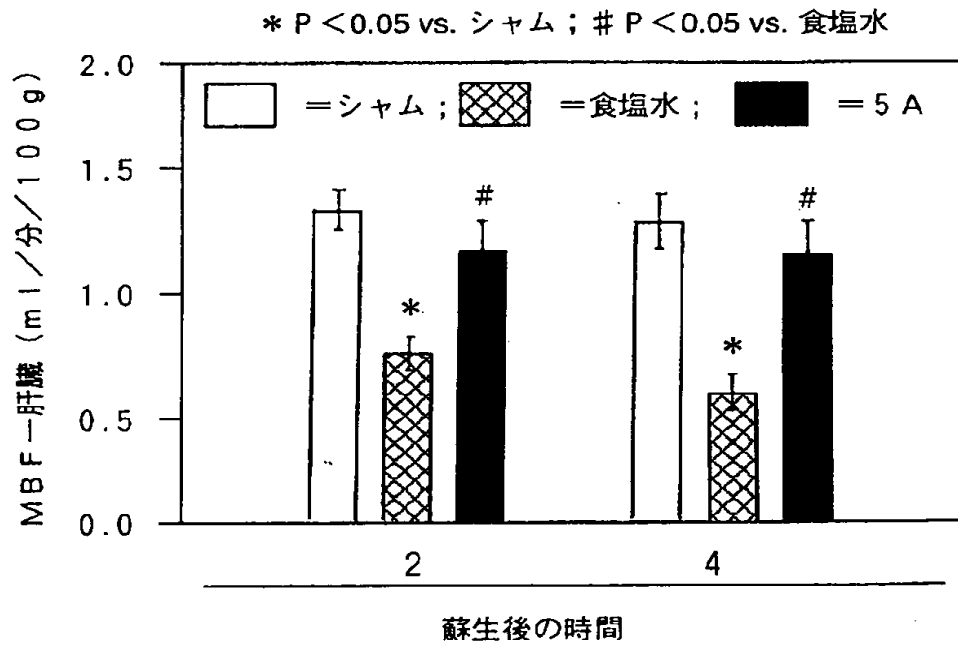
【図12】

Figure 12C



【図13】

Figure 13A



【図13】

Figure 13B

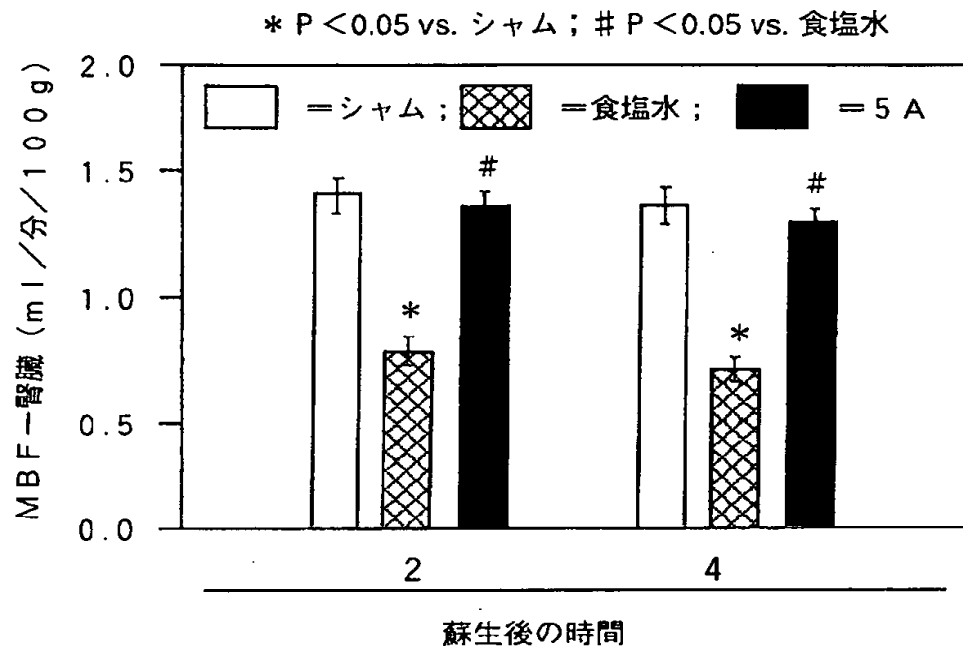
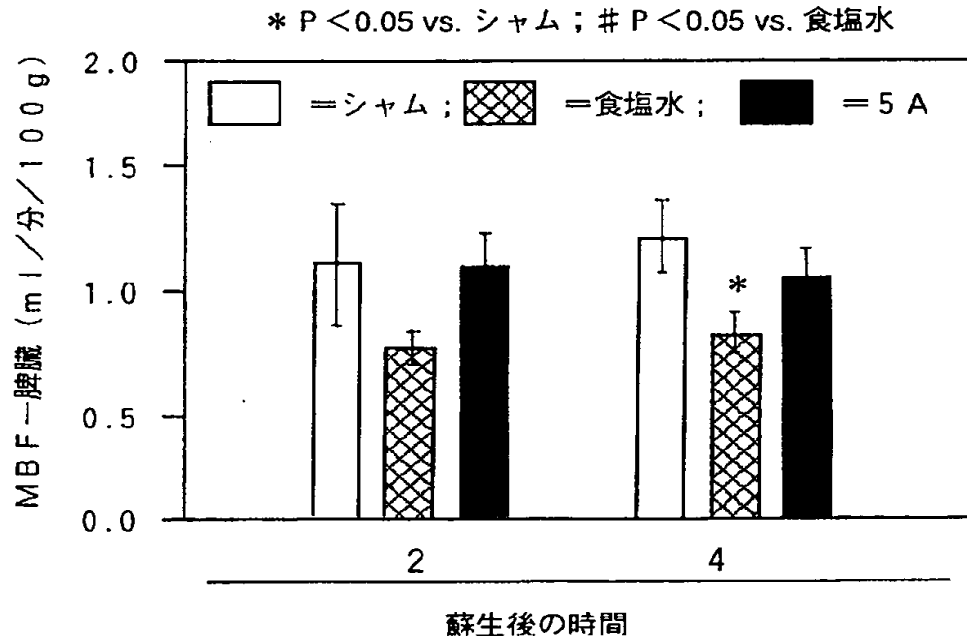
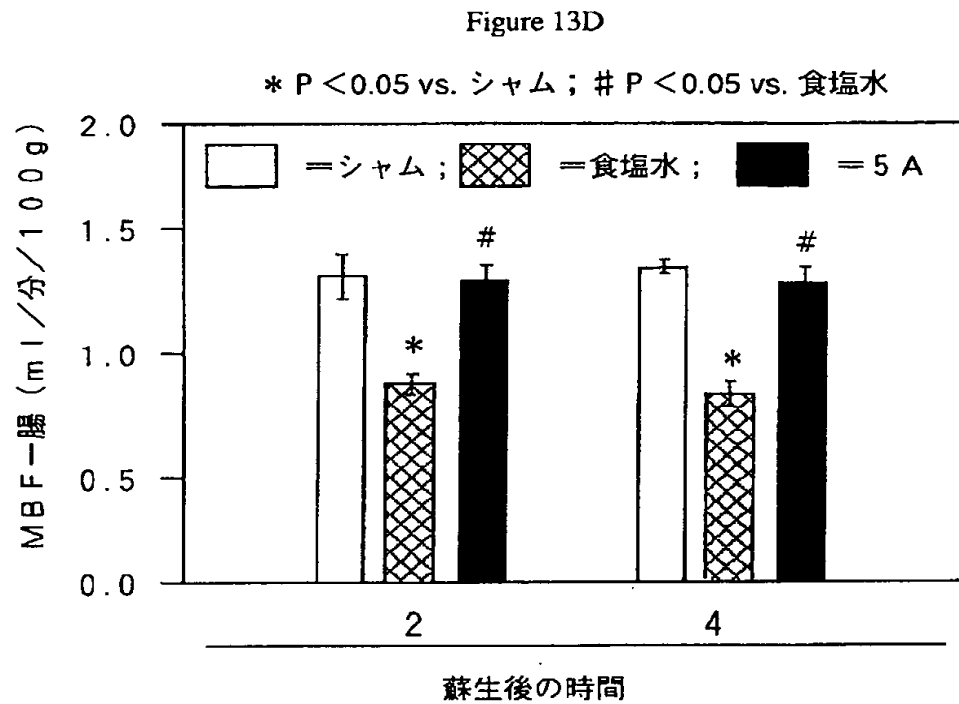


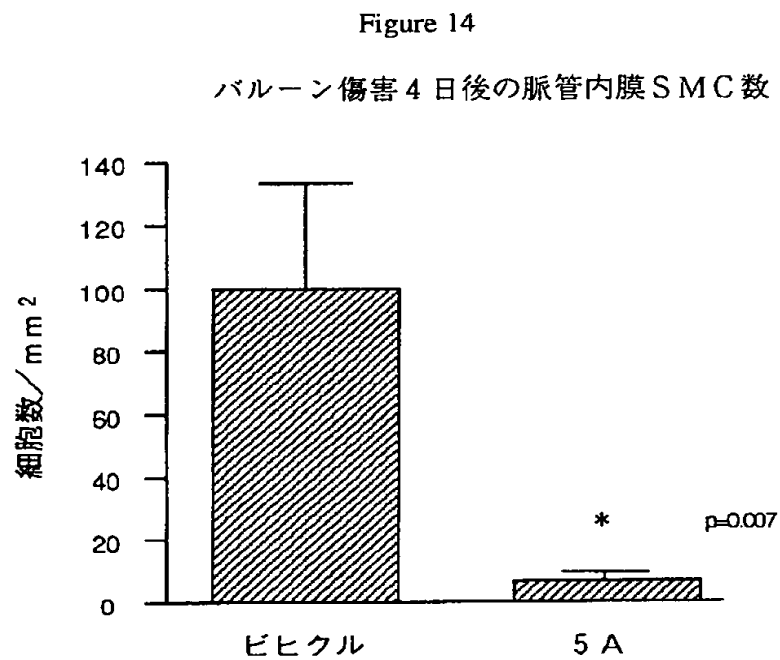
Figure 13C



【図13】



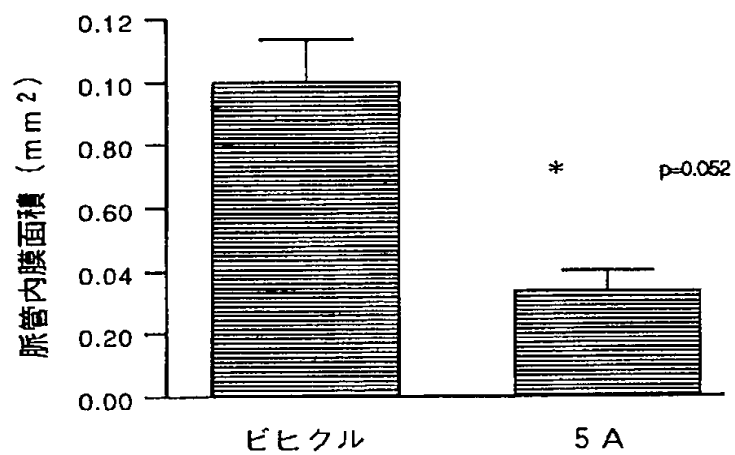
【図14】



【図15】

Figure 15

バルーン傷害10日後の脈管内膜断面



## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 Int. application No  
 PCT/US95/00783

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC(6) : C07D 209/20; A61K 31/405 US CL : 548/495; 514/419 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 548/495; 514/419 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US, A 5,189,179 (GALARDY ET AL) 23 February 1993; see entire document.	1-19
A	US, A, 5,183,900 (GALARDY ET AL) 02 February 1993; see entire document.	1-19
A	US, A 5,114,953 (GALARDY ET AL) 19 May 1992; see entire document, particularly the claims.	1-13
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document published on or after the international filing date "L" document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is considered with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "Z" document member of the same patent family	
Date of the actual completion of the international search 24 APRIL 1995		Date of mailing of the international search report 05 MAY 1995
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703) 305-3230		Authorized officer DAVID B. SPRINGER Telephone No. (703) 308-1235



---

フロントページの続き

- (72)発明者 タング、ペング・チャー  
アメリカ合衆国94556カリフォルニア、モ  
ラガ、カミノ・リカルド827番
- (72)発明者 ホルム、ケビン・アール  
アメリカ合衆国94501カリフォルニア、ア  
ラメダ、マリーナ・ビュー・タワーズ307  
番
- (72)発明者 ガラーディー、リチャード・イー  
アメリカ合衆国06437コネチカット、ギル  
フォード、フォークナー・ドライブ73番
- (72)発明者 シュルツ、グレゴリー・エス  
アメリカ合衆国32605フロリダ、ゲインズ  
ビル、ノース・ウエスト・フォーティフィ  
フス・テラス832番
- (72)発明者 ネマタラ、アッサド  
アメリカ合衆国94501カリフォルニア、ア  
ラメダ、サンタ・クララ529番
- (72)発明者 ムッサー、ジョン・エイチ  
アメリカ合衆国94070カリフォルニア、サ  
ン・カルロス、マイケル・コート23番